

**Histomorphometrische Untersuchung der knöchernen Integration
von Silbernanopartikel-dotierten Osteosynthesematerialien
in einem experimentellen Tiermodell an der Ratte**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Arcan, Fatih
aus Lengerich, Westfalen

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
(Labor für Experimentelle Chirurgie),
unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Heiß,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Meyle

Tag der Disputation: 29.04.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Knocheninfektion	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Diagnostik.....	4
1.1.4	Antibiotikaresistenz	4
1.1.5	Therapie & Prävention	5
1.2	Silbernanopartikel (AgNP)	9
1.3	Aufbau und Funktion des Knochens	11
1.4	Zielsetzung der Studie.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Versuchstiere	15
2.2	Versuchsaufbau	15
2.3	Knochenersatzmaterialien.....	15
2.4	Operation.....	18
2.4.1	Vorbereitung und Narkose	18
2.4.2	Implantation der Knochenersatzmaterialien.....	20
2.4.3	Postoperative Nachsorge.....	21
2.5	Euthanasie.....	22
2.5.1	Vorbereitung und Narkose	22
2.5.2	Probenentnahme	22
2.6	Probenaufbereitung.....	23
2.6.1	Fixation und Entkalkung.....	23
2.6.2	Paraffineinbettung und Schnitterstellung.....	24
2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	25
2.6.4	Enzymhistochemie	25
2.6.4.1	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)	25
2.6.4.2	Alkalische Phosphatase (ALP)	26
2.7	Histomorphometrie	27
2.8	Statistische Auswertung der Daten	31
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Histomorphometrische Auswertung.....	33
3.1.1	Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen	33
3.1.2	Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten	34
3.1.3	Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen.....	36
3.1.4	Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.....	37
3.2	Enzymhistochemische Analyse.....	40
3.2.1	TRAP-Histomorphometrie bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen oder 6 Monaten	40
3.2.2	ALP-positive Oberflächen bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen oder 6 Monaten	44
4	Diskussion	48
4.1	Verwendetes Tiermodell.....	48
4.2	Auswahl der Knochenersatzmaterialien.....	51

4.3	Parameter zum Nachweis der Biokompatibilität der Implantate.....	53
4.4	Einfluss der Implantate auf die Osseointegration	55
4.5	Einfluss von AgNP auf die Biofilmbildung.....	59
4.6	Freisetzung von Ag-Ionen aus AgNP – Biokompatibilität.....	60
4.7	Knochenaufbau und -abbau	61
4.8	Beschichtung von Implantaten	64
4.9	Fazit der Untersuchung	66
5	Zusammenfassung	67
6	Summary	68
7	Abkürzungsverzeichnis	69
8	Abbildungsverzeichnis.....	71
9	Tabellenverzeichnis	73
10	Literaturverzeichnis	74
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	102
12	Danksagung.....	103

1 Einleitung

1.1 Knocheninfektion

1.1.1 Epidemiologie

Periprothetische Infektionen sind in der Orthopädie und Unfallchirurgie häufig vorkommende Komplikationen. Sowohl in medizinischer als auch sozioökonomischer Hinsicht sind solche Infektionen mit erheblichen Konsequenzen verbunden (Hellmann et al. 2010, Otto-Lambertz et al. 2017). Die Rate der relevanten Knocheninfektionen ist bei der Implantation von Biomaterialien als relativ gering einzustufen, die hohe Prävalenz für ossäre Infektionen beruht demnach auf der Häufigkeit solcher Eingriffe (Fang et al. 2017).

Von den jährlich etwa 800.000 implantierten Osteosynthesematerialien in Europa sind 1,5% (n=12.000) mit periprothetischen Infektionen assoziiert. Berücksichtigt werden sollte aber, dass sich die Infektionsraten durch die nötigen Revisionseingriffe um ein Vielfaches potenzieren (Knetsch et Koole 2011). Durch den steigenden Bedarf einer osteosynthetischen Versorgung von Frakturen und Arthroplastiken haben sich auf nationaler und internationaler Ebene Institutionen etabliert, die die Erfolgsraten und Qualität von Implantaten registrieren (Matharu et al. 2018).

Laut Kurtz et al. (2007) steigt weltweit sowohl die Zahl der primären Arthroplastien als auch die der damit zusammenhängenden Revisionen. Nach dem “*National Joint Registry*” (NJR) wurden in England und Wales 2009 von den insgesamt 72.432 durchgeführten hüftendoprothetischen Operationen (OPs) 65.229 als Primäreingriff und 7203 als Revisionen vollzogen. Dies entspricht einer Revisionsrate von 10%. Davon waren 56% auf eine aseptische Lockerung und 3% auf eine Infektion zurückzuführen. Zugleich wurden 77.545 knieendoprothetische Eingriffe gelistet, darunter 4565 Revisionseingriffe (5,9%) (Montanaro et al. 2011). Aufgrund der Unterschätzung der Infektionsraten ist die reale Inzidenz vermutlich weitaus größer (Huotari et al. 2010). Implantat-bedingte Knocheninfektionen haben häufig verheerende gesundheitliche Folgen für den Patienten und verkörpern zugleich ein ökonomisches Problem für den Gesundheitssektor.

1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese einer Implantat-assoziierten Infektion unterscheidet sich in einigen Punkten von anderen postoperativen Infektionen und ist von den verwendeten Knochenersatzmaterialien abhängig. Die Biomaterialien der Implantate werden von einer immun-inkompetenten, fibroinflammatorischen Zone umgeben, in der die zelluläre Immunreaktion über Superoxid-Radikale und Zytokine eine Gewebeschädigung hervorruft, woraus eine erhöhte Suszeptibilität für bakterielle Kolonisierungen sowie rezidivierende Infekte resultiert (Gristina 1994, Schierholz et Beuth 2001).

Experimentelle Studien belegen, dass bei einer chirurgischen Implantation von Fremdmaterialien niedrigere Dosen an bakteriellen Mikroorganismen ausreichen, um eine Infektion auszulösen (Elek 1956, Southwood et al. 1985, Cordero et al. 1996). Ferner werden bei orthopädischen und unfallchirurgischen Eingriffen die Implantate in feste knöcherne Gewebestrukturen eingebracht, wodurch selbst geringfügige Dislokationen und mechanische Irritationen das umliegende Gewebe schädigen. Die lokale Immunschwäche und die Oberflächenstruktur des Fremdmaterials begünstigen die Adhäsion von Bakterien und die damit verbundene Kolonisation. Die beteiligten Mikroorganismen sind mehrheitlich opportunistische Erreger (Campoccia et al. 2006). Die mechanische Adsorption der Bakterien beruht auf verschiedenen Mechanismen, die derzeit im Fokus der Forschung nach neuen antimikrobiellen Therapeutika stehen.

Staphylococcus aureus ist der am häufigsten vorkommende Erreger bei Knochen- und Gelenkinfektionen (Claro et al. 2013, Fang et al. 2017). 16% aller Infektionen sind polymikrobiellen Ursprungs, wobei bei einem Großteil der Implantat-assoziierten Infektionen Staphylokokken beteiligt sind. Neben *Staphylococcus aureus* spielt auch *Staphylococcus epidermidis* in diesem Kontext eine wichtige Rolle – die beiden Spezies sind gemeinsam für etwa 66% aller Implantat-assoziierten Infektionen verantwortlich (Campoccia et al. 2006, Penalba Arias et al. 2015) (Abb. 1). Weitere Koagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*) gelten bei 13% der Implantat-assoziierten Infektionen als Verursacher. Andere Spezies wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* und *Streptococci* haben mit insgesamt 24% eine geringere Relevanz.

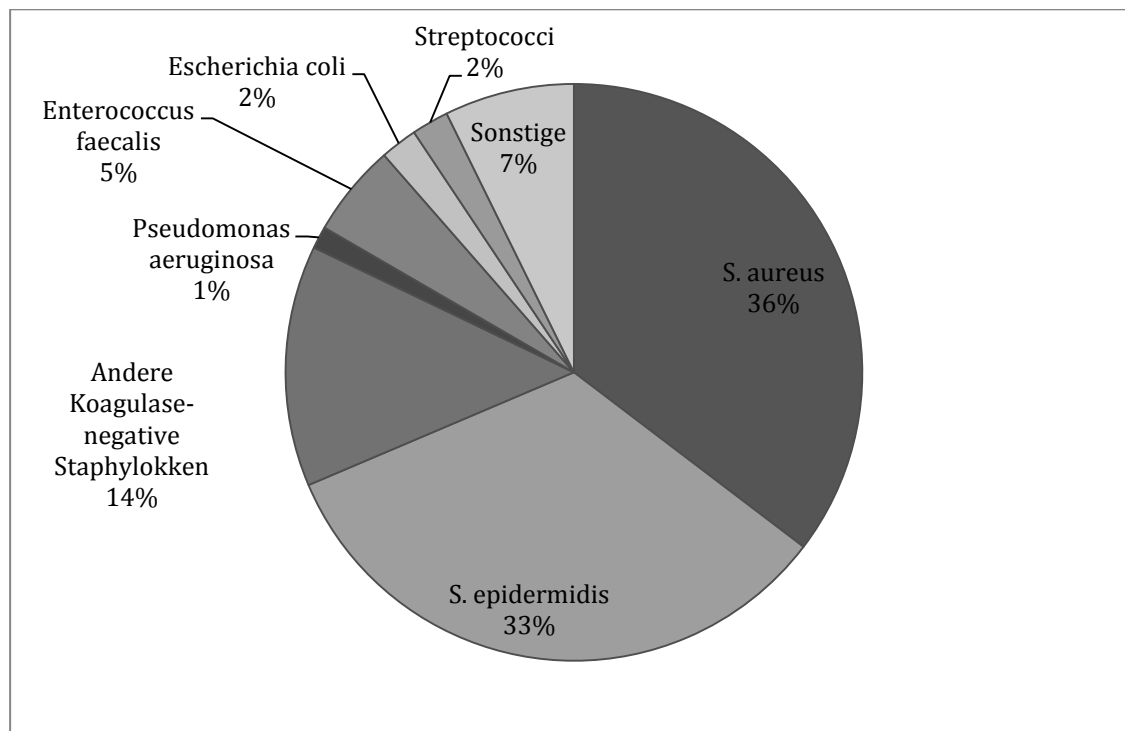


Abbildung 1: Verursacher von Implantat-assoziierten Infektionen; modifiziert nach (Campoccia et al. 2006)

Sowohl die bakterielle Virulenz als auch wirtsabhängige Faktoren (z.B. Immunstatus, Komorbiditäten) spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung von Knocheninfektionen. *Staphylococcus aureus* besitzt verschiedene Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, die die Anheftung an die Knochenmatrix erleichtern. Diese Adhäsine interagieren mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Proteine, Kohlenhydrate) und sind so für die Kolonisation verantwortlich. Zu den Virulenzfaktoren gehören Proteasen, die Komponenten der Knochenmatrix zerstören und die Ausbreitung des Pathogens fördern (Patti et al. 1994, Hudson et al. 1999, Balachandran et al. 2017, Bleiziffer et al. 2017). Eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielt die Ausbildung eines Biofilms auf der Implantatoberfläche. Biofilme sind strukturierte Verbände von Bakterien, die von einer selbst produzierten Matrix umhüllt sind. Die Zusammensetzung der Matrix hängt von der bakteriellen Spezies, dem Erregerstamm und den Umgebungsbedingungen ab und enthält Exopolysaccharide, Proteine, Teichonsäure und extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Hoiby et al. 2011). Die Matrix des Biofilms schützt die Bakterien vor Immunangriffen und vor einer anti-

biotischen Therapie (Arciola et al. 2002, Götz 2002, Valour et al. 2015). Die Verhinderung der Biofilmbildung ist für die Entwicklung von effektiven antimikrobiellen Strategien ein wichtiger Angriffspunkt.

1.1.3 Diagnostik

Die Differenzierung zwischen einer okkulten Implantat-assoziierten Infektion und einem biomechanisch aseptischen Versagen ist im klinischen Alltag ein häufig auftretendes Problem. Frühe postoperative (innerhalb der ersten 3 Monate) und hämatogene Gelenkprotheseninfektionen werden von virulenten Organismen wie *Staphylococcus aureus* verursacht und sind durch akute Symptome sowie typische Infektionszeichen charakterisiert (Trampuz et al. 2003). Dagegen entwickeln sich späte postoperative Gelenkprotheseninfektionen schleichend, da sich durch wenig virulente Organismen wie Koagulase-negative Staphylokokken hervorgerufen werden und entsprechend subtile Inflammationszeichen aufweisen (Roux et al. 2016). Die fehlende Standardisierung der Kriterien für die Detektion von Implantatinfektionen und die Gefahr von falsch-negativen bzw. falsch-positiven Kulturergebnisse führen potentiell zu unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen (Neut et al. 2003, Trampuz et al. 2003). Bislang sind keine klinischen bzw. Labortests verfügbar, die eine Implantatinfektion mit adäquater Sensitivität und Spezifität nachweisen. In den meisten Fällen wird die Diagnose einer Implantatinfektion auf der Basis von klinischen Symptomen, radiologischen Befunden und Laborergebnissen erstellt (Peeters et al. 2016).

1.1.4 Antibiotikaresistenz

Die zunehmende Verbreitung von Antibiotikaresistenzen, die eingangs vor allem gramnegative Bakterien, inzwischen aber auch zunehmend grampositive Bakterien betrifft, hat sich zu einem weitreichenden Problem entwickelt (Theuretzbacher 2011, 2012). Klinisch bedeutsam ist beispielsweise der β -Lactamase-positive und damit Penicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (Bush 2018). Zunächst wurde die Problematik der bakteriellen Resistenz durch die Entwicklung neuer Antibiotikaklassen

(z.B. Aminoglykoside, Makrolide, Glykopeptide) und durch die chemische Modifizierung von Antibiotika gelöst. Für die Zukunft besteht jedoch keine Garantie, der Zunahme von bakteriellen Resistenzen durch die Entdeckung neuer Antibiotika entgegenwirken zu können (Ridenhour et al. 2017, Duan et Kumar 2018).

Verschiedene Studien belegen, dass Biofilm-produzierende Bakterien, die auf Biomaterialien bzw. periprothetischen Oberflächen vorkommen, über eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika verfügen (Nickel et al. 1985, Evans et Holmes 1987, Prosser et al. 1987, Schwank et al. 1998, König et al. 2001, Mah et O'Toole 2001).

Schwank et al. (1998) untersuchten beispielsweise die Antibiotikassuszeptibilität (Amikacin, Levofloxacin, Rifampicin, Teicoplanin) zweier isogener Erregerstämme von *Staphylococcus epidermidis* mit differenten Biofilmbildungseigenschaften. Der Biofilm-bildende Stamm *Staphylococcus epidermidis* RP62A zeigte im Vergleich zu dem solitär lebenden Stamm *Staphylococcus epidermidis* M7 eine signifikant erhöhte Antibiotikaresistenz.

Die Behandlung Implantat-assoziiierter Infektionen erfordert häufig eine Langzeithospitalisierung sowie eine verlängerte parenterale Antibiotikatherapie. Oftmals bleibt keine andere therapeutische Alternative als die Revision des infizierten Implantats (Costerton et al. 1999, Varisco et al. 2014).

1.1.5 Therapie & Prävention

Eine chirurgische Behandlung von Frakturen an der Tibia erfordert eine stabile Fixation, wobei darauf zu achten ist, dass bei der Einführung des Implantats sekundäre Traumata am Weichteilgewebe möglichst vermieden werden (Kuhn et al. 2015b). Die traditionelle offene Reposition und interne Fixation (ORIF) hat den Nachteil der Devaskularisierung von Fragmenten und der damit verbundenen zusätzlichen Schädigung der Weichteile (Kuhn et al. 2015b). Die minimal invasive Plattenosteosynthese (MIPO) reduziert diese Nachteile und hat die klassische ORIF-Technik bei einfachen intraartikulären Frakturen der Tibia weitestgehend abgelöst (Kuhn et al. 2015b). Die Entwicklung von Tibia-Marknägeln mit multiplen multidirektionalen Verriegelungsmechanismen hat zu einer Ausweitung der Indikation für ein intra-medulläres Implantat geführt (Kuhn et al. 2007, El Attal et al. 2011, Meena et al. 2015).

Diese Marknägels erlauben die Platzierung von bis zu vier distal verriegelnden Schrauben in drei verschiedenen Ebenen innerhalb eines 50 mm großen Tibiaplafonds (Kuhn et al. 2008). Die technisch herausfordernde intramedulläre Nagelung schont die Vaskularisierung der Frakturseite und bewahrt die Integrität des Weichteilgewebes, wobei aber das Risiko der Fixation der Fragmente in einer nicht-anatomischen Position besteht (Kuhn et al. 2015b). Zur Verhinderung dieses Problems werden Pollerschrauben oder eine intramedulläre Blockierung verwendet (Hannah et al. 2014). Je weiter distal die Fraktur reicht, desto geringer ist die Stabilität, die durch die intramedulläre Nagelung gewährleistet werden kann. Ferner ändert sich der Querschnitt der Tibia vom distalen Schaft zur Metaphyse von einer engen triangularen in eine runde Form (Kuhn et al. 2015b).

Medizinische Fortschritte der vergangenen Jahre ermöglichen eine effektive Therapie bestehender Implantatinfektionen und minimieren ihre deletären Auswirkungen (Zimmerli et Ochsner 2003, Campoccia et al. 2006). Im Vordergrund steht aber die Prävention in Form von strategischen Maßnahmen zur Verhinderung von Implantat-assoziierten Knocheninfektionen. Dazu gehört die Entwicklung von infektions-resistenten Biomaterialien, z.B. durch die Beschichtung mit Antimikrobiotika, Hydroxylapatit (HA) (Arciola et al. 1999), Tenside, Heparin oder Albumin (Arciola et al. 1993, 1995, 2003).

Aufgrund der hohen Biokompatibilität und der bewährten mechanischen Eigenschaften gehören Polymethylmethacrylat-(PMMA)-Knochenzement und Implantate aus Titanlegierungen zu den häufig eingesetzten Biomaterialien bei Arthroplastiken. Daneben ist das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Geweberegenerierung eines der am meisten benutzten natürlichen Polymere in der Orthopädie und Unfallchirurgie (Abou Neel et al. 2013). Zur Verhinderung von Infektionen werden diese Kollagenmaterialien in Antibiotikallösungen getränkt (Inzana et al. 2016). Dennoch stellen bakterielle Kolonisierungen auf der Oberfläche von Osteosynthesematerialien eine gefürchtete Komplikation dar, die für die Patienten mit verheerenden gesundheitlichen Folgen verbunden ist (Berbari et al. 1998, Lentino 2003, Jafari et al. 2010, Matar et al. 2010, Renaud et al. 2012). Bakterien der Wirtsflora adhärieren an die Implantatoberfläche und kapseln sich in eine selbst produzierte extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA ein (Lentino 2004, Wei et Ma 2013). Dieser Biofilm breitet sich an der Kontaktstelle zwischen Knochen und Implantat aus und beschädigt das umliegende Knochengewebe.

Daher wurden Versuche unternommen, über eine Beschichtung von Implantaten mit Antibiotika der bakteriellen Besiedlung entgegenzuwirken (Chang et al. 2013, Galvez-Lopez et al. 2014). Buchholz und Engelbrecht (1970b) waren die ersten, die für eine lokale Antibiotikaphylaxe bei einer Arthroplastik den PMMA-Knochenzement mit Antibiotika imprägnierten. Das Aminoglykosid Gentamicin ist aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums und seiner Thermostabilität für die Beschichtung von Zement und Titanimplantaten geeignet (van de Belt et al. 2001, Alt et al. 2006, Schmidmaier et al. 2017). Klinische Studien belegen, dass Antibiotika-dotierter Knochenzement das Auftreten von Osteomyelitis bei einer totalen Hüftendoprothese verringert und zusammen mit einer systemischen Antibiotikagabe die Revisionsrate aufgrund von aseptischer Implantatlockerung dezimiert (Engesaeter et al. 2003, Kendoff et al. 2016).

Da in den vergangenen Jahrzehnten die Zahl der Infektionen mit multiresistenten Bakterien angestiegen ist, können Implantat-assoziierte Infektionen häufig nicht mit herkömmlichen Antibiotika effektiv bekämpft werden (Campoccia et al. 2006). Entsprechend werden neue antiseptische Wirkstoffe gesucht. Zu diesen zählen Silbernanopartikel (AgNP), die auf ein breites Spektrum an Mikroorganismen bakterizid wirken (Kim et al. 2007, Choi et al. 2008, Lu et al. 2008, Lara et al. 2010a, Arora et al. 2013). Mehrere Studien bestätigen die antiseptischen Eigenschaften von AgNP gegenüber multiresistenten Bakterien (Lara et al. 2010b, Oei et al. 2012). Der besondere Vorteil der AgNP gegenüber Antibiotika ist ihre Fähigkeit, in bestehende Biofilme einzugreifen und dort Bakterien zu erreichen (Kalishwaralal et al. 2010, Mohanty et al. 2012, Naik et Kowshik 2017). Mit AgNP dotiertes PMMA und Titan verfügt über eine ausreichende Biokompatibilität (Pauksch et al. 2014a).

Mit 1% AgNP dotierter PMMA-Knochenzement wirkte in einer Studie antibakteriell, ohne die Proliferation von Osteoblasten negativ zu beeinflussen (Alt et al. 2004a). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Alarcon et al. (2015) mit einem mit AgNP dotierten Kollagen-Hydrogel für Gewebekonstruktionen. Hybridmaterialien mit einem AgNP-Gehalt von $<0,4 \mu\text{M}$ erwiesen sich für primäre humane Fibroblasten und Keratinozyten als unschädlich und wirkten gegenüber *Staphylococcus aureus* und weiteren Bakterien anti-infektiös. Subkutane $0,2 \mu\text{M}$ AgNP-Implantate reduzierten in Mäusen Interleukin-(IL)-6 und andere Inflammationsmarkern wie Chemokin-Ligand 24 (CCL24), *soluble tumor necrosis factor receptor-2* (sTNFR-2) und *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (TIMP1) (Alarcon et al. 2015). Eine Beschichtung mit AgNP-dotierten Titan-Nanoröhren führt zu einer Silber-(Ag)-Ionenfreisetzung in effektiver antibakterieller

Konzentration über einen Zeitraum von mehr als 15 Tagen (Wang et al. 2013). Diese kontinuierliche Freisetzung von Ag-Ionen kann für eine langfristige antibakterielle Prävention nach Implantation von Osteosynthesematerialien genutzt werden. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Nanostruktur bei einem geringen AgNP-Anteil die Bakterienproliferation zu 99,99% verhindert, ohne die Osteogenese zu stören oder auf Zellen toxisch zu wirken (Wang et al. 2013).

Pauksch et al. (2014b) untersuchten den Einfluss von AgNP auf den Zellstress, die Funktionsfähigkeit, die Proliferation und Differenzierung primärer humaner mesenchymaler Stammzellen und Osteoblasten. Sie stellten bei einer Konzentration von 10 µg/g AgNP nach 21 Tagen eine Verminderung der Zellfunktion der mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten fest. Die detektierte Zytotoxizität und Inhibition der Proliferation war zeit- und konzentrationsabhängig. Die Zelldifferenzierung wurde durch AgNP nicht beeinflusst, jedoch wurde eine Erhöhung des Zellstress registriert (Pauksch et al. 2014b).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von mit 4000 µg/g AgNP und/oder Gentamicin (1,34%) dotiertem PMMA-Knochenzement auf die Funktionsfähigkeit, Proliferation und Differenzierung primärer humaner mesenchymaler Stammzellen und Osteoblasten getestet (Pauksch et al. 2014c). Die Zytokompatibilität war in den Versuchsgruppen (PMMA-Zement mit AgNP, PMMA-Zement ohne AgNP, PMMA-Zement mit Gentamicin) vergleichbar (Pauksch et al. 2014c). Nach 21 Tagen bestanden keine Hinweise auf eine Reduzierung der Zellzahl, eine Funktionseinschränkung, eine Behinderung der osteogenen Differenzierung und kein oxidativer Zellstress für alle drei PMMA-Varianten. Die PMMA-Zementimplantate, die gleichzeitig mit AgNP und Gentamicin dotiert waren, zeigten eine leicht niedrigere osteogene Differenzierung und einen erhöhten Zellstress. Die Zytokompatibilität der doppelt-dotierten PMMA-Zementimplantate war somit niedriger als die der ausschließlich mit AgNP dotierten Implantate (Pauksch et al. 2014c).

Des Weiteren untersuchten Pauksch et al. (2014a) den Einfluss von mit 4000 µg/g AgNP dotierten PMMA-Zement und Titan (TiAl₆V₄-ELI) auf die Differenzierung von humanen peripheren mononukleären Blutzellen in Osteoklasten. Beide mit AgNP dotierten Implantate inhibierten nicht die Osteoklastogenese und zeigten ferner eine hervorragende Zellanheftung sowie eine unveränderte Struktur der Podosomen. Auffällig war jedoch, dass mit AgNP und Gentamicin (1,34 %) dotierter PMMA-Knochenzement die Fusion von Präosteoklasten und somit die Osteoklastogenese

hemmte. Die Autoren schlossen auf einen synergistischen toxischen Effekt der Doppelbeschichtung. Als potentiellen Mechanismus postulierten sie eine Oberflächenvergrößerung des Implantats und daraus folgende gesteigerte Ag-Ionenfreisetzung durch die Elution von Gentamicin aus dem Knochenzement (Pauksch et al. 2014a).

1.2 Silbernanopartikel (AgNP)

Die antiseptische und desinfizierende Wirkung von Ag ist seit rund 3000 Jahren bekannt. Die medizinische Nutzung von Ag und Ag-Verbindungen geriet im Zuge der Entwicklung und Anwendung von Antibiotika zunehmend in den Hintergrund. Durch die Resistenzbildung haben viele Antibiotika ihre Wirkung gegenüber Keimen verloren. Multiresistente Keime sind schwer zu behandeln und verursachen lebensbedrohliche Infektionen mit hoher Morbidität. Die Integration von bzw. Beschichtung mit AgNP von Knochenersatzmaterialien stellt daher eine Alternative in der Orthopädie und Unfallchirurgie zur Infektionsprophylaxe dar.

Die Nanotechnologie bietet ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten in biomedizinischen und elektronischen Fachbereichen. AgNP gehören weltweit zu den kommerziell erfolgreichsten Nanoprodukten, da ihre antiseptische Wirkung in vielen Bereichen, wie Kosmetika, Nahrungsmittel (Yang et al. 2017, Olmos et al. 2018), Textilien, Verpackungen, Reinigungs- und Desinfektionsmittel sowie Medizinprodukte, genutzt wird (Schluesener et Schluesener 2013, Das et al. 2017, Jiang et al. 2017, Li et al. 2017). Kritiker sehen in dem ausgedehnten Einsatz von Nanomaterialien auch eine ökologische Belastung. Die Freisetzung der AgNP könnten die Umwelt schädigen (Dobrzynska et al. 2014).

In der Medizin wird der antimikrobielle Effekt von Ag in verschiedenen Bereichen (Infektionskrankheiten, Hautverbrennungen, Oberflächenbeschichtung von Kathetern und Prothesen) genutzt, um bakterielle Kolonisierungen prophylaktisch zu verhindern (Zhou et al. 2016, Jiang et al. 2017).

AgNP besitzen eine Größe von 5–50 nm. Das hauptsächlich elementare, ungeladene Ag bildet in den Partikeln Agglomerate mit vielen Poren, wodurch die Oberfläche stark vergrößert wird (Alt et al. 2004c). Mit etwa 500–1000 nm sind Ag-Partikel um den

Faktor 20 größer, besitzen aber mit 1–2 m²/g eine nur halb so große, aktive Oberfläche wie AgNP (Alt et al. 2004c).

Vorteilhaft ist, dass aufgrund der verhältnismäßig großen Oberfläche und der damit verbundenen, effektiven Ag-Ionenfreisetzung der Bedarf an AgNP deutlich reduziert werden kann (Liu et al. 2010, Ding et al. 2017). Die freigesetzten positiven Ag-Ionen adhären an der Oberfläche von gramnegativen Bakterien, schädigen die Zellmembran und verursachen im Zellinneren Schäden an der DNA (Jiang et al. 2017). Für *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wurde nachgewiesen, dass AgNP über die Kondensation von DNA-Molekülen die Replikation beeinträchtigen (Feng et al. 2000, Gonzalez et al. 2016). Ferner schalten sie Proteine der Bakterien aus, indem die Ag-Ionen an die Thiolgruppen der Proteine binden (Unosson et al. 2016).

Ein wesentlicher Aspekt bei der *in vitro* bzw. *in vivo* Anwendung ist das Ausmaß der Ag-Ionenfreisetzung aus AgNP. Einerseits muss die Freisetzung groß genug sein, um eine antiseptische Wirkung zu erzeugen, andererseits sollen zytotoxische Effekte auf die umliegenden Zellen vermieden werden. Zu hohe Ag-Ionenkonzentrationen führen über oxidativen Stress zur Apoptose der Zellen (Kim et al. 2012b).

AgNP zeigten in höherer Konzentration einen zytotoxischen Effekt auf humane mesenchymale Stammzellen (Greulich et al. 2009). In den Experimenten wurden sphärische AgNP mit einem Durchmesser von 100 nm eingesetzt. Bei einem AgNP-Gehalt um 2,5 µg/ml wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen aktiviert und produzierten IL-8 (Chemokin). Die zytotoxische Zellreaktion fand hingegen erst ab einer Konzentration von 5 µg/ml AgNP statt.

Patlolla et al. (2015) applizierten Sprague-Dawley Ratten täglich 5 Tage lang AgNP in aufsteigender Dosierung (5, 25, 50, 100, mg/kg) und untersuchten das Knochenmark jeweils 24 h nach der letzten Intervention. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten die behandelten Ratten signifikant erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies, strukturelle Chromosomenaberrationen und einen verringerten Mitoseindex durch die DNA-Schäden. Die toxischen Effekte der AgNP wurden durch weitere *in vitro* Analysen bestätigt (Flower et al. 2012, Song et al. 2012, Xue et al. 2012, Zhao et al. 2017).

Von großer Bedeutung für die bakteriostatische Wirkung der AgNP ist neben der Konzentration und Expositionsdauer auch die Größe der Partikel und die daraus resultierende Oberflächengröße. Kleinere AgNP mit ihrer relativ größeren Oberfläche

besitzen im Vergleich zu größeren Partikeln eine stärkere antiseptische Wirkung (Khurana et al. 2014).

1.3 Aufbau und Funktion des Knochens

Das Skelettsystem des Menschen besteht aus Knochen sowie Knorpelgewebe. Es dient dem Schutz der inneren Organe und des Knochenmarks, bietet Muskelansatzstellen für die Fortbewegung und besitzt zudem essentielle metabolische Funktionen. Zu Letzteren zählen der Calcium- und Phosphat-Haushalt (Hadjidakis et Androulakis 2006). Der Knochen unterliegt ständig einem Prozess der Remodellierung, an dem Osteoblasten und Osteoklasten maßgeblich beteiligt sind (Hadjidakis et al. 2006).

Die langen Röhrenknochen bestehen aus der hohlförmigen Diaphyse, der kegelförmig aufgeweiteten Metaphyse unterhalb der Wachstumsplatte und aus der Epiphyse oberhalb der Wachstumsplatte. Die Diaphyse enthält primär kortikalen Knochen, wohingegen bei der Metaphyse und Epiphyse eine relativ dünne Schicht aus kortikalem Knochen ein netzartiges Trabekelwerk umgibt (Clarke 2008). Insgesamt besteht das adulte menschliche Skelett zu 80% aus kortikalem und zu 20% aus trabekulärem Knochen (Hadjidakis et al. 2006). Dieses Verhältnis ist aber nicht für alle Knochen identisch. Bei Wirbelkörpern liegt das Verhältnis bei 25:75, beim Femurkopf bei 50:50 und in der Radiusdiaphyse bei 95:5 (Clarke 2008).

Der kortikale Knochen besitzt eine kompakte Konsistenz und umgibt das Knochenmark. Der trabekuläre Knochen besteht dagegen aus einem wabenartigen Netzwerk von Platten und Röhren. Sowohl kortikale als auch trabekuläre Knochen sind aus Osteonen aufgebaut. Die kortikalen zylindrischen Osteone werden als Haverssche Systeme bezeichnet. Die Wände der Haversschen Systeme sind aus konzentrischen Lamellen formiert. Die Porosität der kortikalen Knochen liegt meist unter 5%, wobei dieser Wert in Abhängigkeit vom Verhältnis der aktiven Haversschen Systeme und der inaktiven Osteone variieren kann. Die Remodellierung der Kortikalis führt zu einer zunehmenden kortikalen Porosität und zu einer Verminderung der kortikalen Knochenmasse (Clarke 2008).

Die periostale äußere Begrenzung der kortikalen Knochen ist für das Wachstum und die Frakturheilung von Bedeutung. An der periostalen Oberfläche übersteigt die

Knochenbildung die Knochenresorption, so dass der Knochendurchmesser mit zunehmendem Alter wächst. Die endostale Oberfläche hat aufgrund der größeren biomechanischen Belastung und dem Kontakt zu den vom Knochenmark ausgeschütteten Zytokinen eine stärkere Remodellierungsaktivität als das Periost. Im Endost übersteigt die Knochenresorption die Knochenbildung, wodurch das Knochenmarkareal mit der Zeit größer wird (Clarke 2008).

Die dünne Gewebsschicht des Periosts umgibt mit Ausnahme der überknorpelten Gelenkflächen die Außenfläche aller Knochen. Die äußere, zellarme Schicht (*Stratum fibrosum*) besteht vornehmlich aus kollagenen Fasern (*Sharpeys` fiber*), die sich bis in die innere Schicht in die *Substantia compacta* ziehen und das Periost verankern. Die innere Schicht des Periosts (*Stratum osteogenicum*), bestehend aus Blutgefäßen, Nerven und Osteoblasten, ist im Vergleich zur äußeren Schicht relativ zellreich. Das Endost ist eine membranöse Struktur, die die innere Oberfläche der kortikalen/trabekulären Knochen und der Gefäßkanäle (Haversche Kanäle) bedeckt (Clarke 2008).

Aus histologischer Sicht stellt der Knochen ein mineralisiertes Bindegewebe mit vier verschiedenen Zelltypen – Osteoblasten, Saumzellen (*bone lining cells*), Osteozyten und Osteoklasten – dar (Downey et Siegel 2006). Trotz des starren Erscheinungsbildes ist der Knochen ein dynamisches Organ, das stets von Osteoklasten resorbiert und von Osteoblasten neu synthetisiert wird (Florencio-Silva et al. 2015).

Knochenzellen bilden etwa 10% des gesamten Knochenvolumens und stammen von zwei Zelllinien ab. Osteoprogenitorzellen entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen, die zunächst zu Präosteoblasten und später zu Osteoblasten und Osteozyten differenzieren. Osteoprogenitorzellen liegen hauptsächlich in knöchernen Kanälen, im Endost, Periost sowie im Knochenmark vor. Bei Bedarf gelangen sie an die entsprechende Lokalisation, um dort zu Osteoblasten zu differenzieren (Buck et Dumanian 2012).

Saumzellen (*bone lining cells*) sind eine Osteoblastenzelllinie, die ihre synthetische Funktion abgeschlossen haben. Saumzellen sind wesentlich häufiger als synthetisierende Osteoblasten und bedecken als abgeflachte Zellen die Oberfläche von Knochenkomponenten (Kim et al. 2012a).

Osteoblasten umgeben die Oberfläche von Knochen und liegen eng aneinander an. Als knochenaufbauende Zellen synthetisieren sie die organische Knochenmatrix. Biochemisch werden sie durch die Ausschüttung von alkalischer Phosphatase (ALP)

charakterisiert (Clarke 2008). Die reifen Osteoblasten können zu Osteozyten bzw. Saumzellen transformieren oder eine Apoptose durchlaufen (Clarke 2008). Zu den wichtigen Mediatoren der Osteoblastendifferenzierung und -aktivierung gehören unter anderem *bone morphogenetic protein* (BMP) und *transforming growth factor-beta* (TGF- β) (Buck et al. 2012, Florencio-Silva et al. 2015).

Osteozyten machen als terminal differenzierte Osteoblasten etwa 90% aller knöchernen Zellen aus (Buckwalter et al. 1995). Die langlebigen Osteozyten sind von organischer Matrix umgeben und befinden sich innerhalb von Lakunen. Osteozyten reagieren auf biomechanische Belastung und senden über kanalikuläre Prozesse Signale an die Knochenoberfläche. Osteozyten entwickeln zytoplasmatische Ausläufer, die den ganzen Knochen durchziehen und mit benachbarten Osteozytenausläufern über *Gap junctions* kommunizieren. Osteozyten sind an der Erhaltung der Knochenmatrix und Calciumhomöostase beteiligt und regulieren die Knochenresorption mittels Parathormon (Clarke 2008, Buck et al. 2012, Martin 2014).

Osteoklasten sind dagegen hämatopoetischen Ursprungs (Stein et Lian 1993, Buckwalter et al. 1995, Aubin 2001, Clarke 2008). Die großen mehrkernigen Zellen befinden sich während der Knochenresorption in flachen Vertiefungen an der Knochenoberfläche (Howship Lakunen) (Clarke 2008). Beim Remodelling und bei Frakturheilungsprozessen können Osteoklasten auch in Resorptionstunneln vorkommen, die als *cutting cone* bezeichnet werden. Bei Anheftung der Osteoklasten über den Faltenaum (*ruffled border*) an die Knochenmatrix lösen sie die Knochenmatrix mittels Ansäuerung auf und phagozytieren sie dann. Hierfür wird durch den aktiven Transport von Protonen über die V-Typ H^+ Adenosintriphosphatase (ATPase) ein saures Mikrokompartment unter dem Faltenaum geschaffen. Der passive Transport von Chlorid durch den Chlorid-Kanal-7 gewährleistet die Elektroneutralität. An der Resorption der Knochenmatrix durch Osteoklasten sind auch proteolytische Enzyme, insbesondere Kathepsin K, beteiligt (Buckwalter et al. 1995, Bruzzaniti et Baron 2006, Clarke 2008, Buck et al. 2012).

1.4 Zielsetzung der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *in vivo* Analyse der Biokompatibilität von AgNP-beschichteten Osteosynthesematerialien. Dazu wurde an Ratten eine Osteosynthese der Tibia mit intramedullären Implantaten durchgeführt. Die Gruppen aus je 6 Ratten erhielten Implantate aus verschiedenen Materialien (PMMA-Zement, Titan, Kollagen Typ I) mit unterschiedlichen Dotierungen (keine, Gentamicin, AgNP). Nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen oder 6 Monaten wurden histomorphometrische Untersuchungen von repräsentativen Querschnitten der Tibiae durchgeführt. Analysiert wurden die Anteile der Knochentrabekelfläche und die Anteile der Knochenneubildung als Maß für die Osseointegration. Weiter wurden die Anzahl der Osteoklasten (Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) positive Zellen) und Osteoblasten (ALP-positive Zellen) quantifiziert. Mit dem Modell sollten verschiedene Frage beantwortet werden:

- Wie beeinflusst eine AgNP-Dotierung die Osseointegration?
- Unterscheiden sich die Implantat-Gruppen im Hinblick auf die Anteile der Knochentrabekelflächen und der Knochenneubildung?
- Korrelieren die Daten der Enzymhistochemie (TRAP- und ALP-positive Zellen) mit den Osseointegrationsdaten?
- Gibt es bei den untersuchten Parametern signifikante Unterschiede zwischen den Standzeiten?

Die Ergebnisse sollen zur Weiterentwicklung AgNP-dotierter Implantate beitragen und letztlich helfen Knochenersatzmaterialien für die Klinik zu entwickeln, die zugleich eine ausreichende antimikrobielle Potenz und eine möglichst große Biokompatibilität besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 72 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet, die zum Zeitpunkt der OP ein Gewicht von etwa 400 g aufwiesen und 16 Wochen alt waren. Die Tierversuche wurden nach den Regeln des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI Nr. 20/14 Nr. 120/2012). Sowohl die Tierhaltung als auch die Versuchsdurchführung erfolgten im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen. Zur Akklimatisierung wurden die Ratten 3 Wochen vor Beginn der Versuche eingestallt. Den Tieren wurde sowohl Wasser als auch handelsübliches Futter *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

2.2 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden in 12 Gruppen mit jeweils 6 Ratten (n=72) eingeteilt. Je 36 Tiere wurden nach einer postoperativen Standzeit von 4 Wochen bzw. 6 Monaten euthanasiert. Anschließend erfolgte die Probenentnahme. Für eine sichere Identifizierung wurden die Tiere mit Stanzlöchern gemäß einem Ohrmarken-Schema markiert.

2.3 Knochenersatzmaterialien

Die verschiedenen Implantate wurden den Ratten über das Tibiaplateau (Abb. 2) in die *Cavitas medullaris* eingesetzt (Tab. 1).

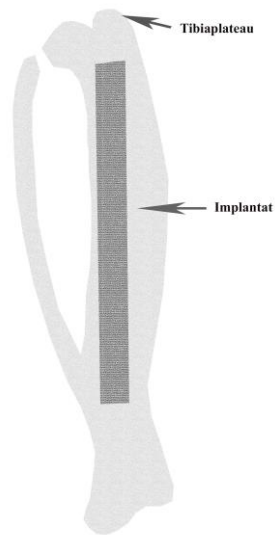
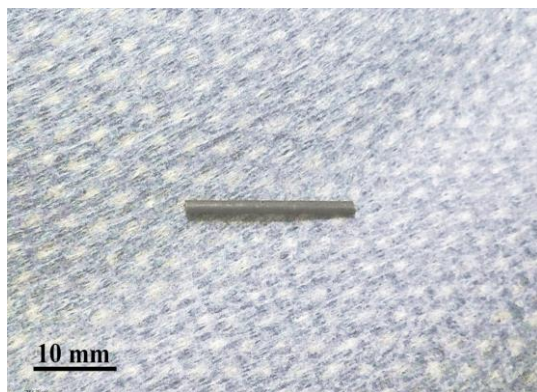
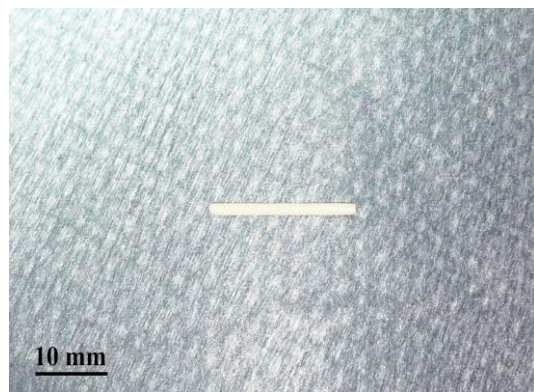


Abbildung 2: Schemazeichnung der Tibia und Fibula einer Ratte samt Implantat in der Cavitas medullaris der Tibia

Die Implantate, die in die proximale Tibia eingesetzt wurden, waren 2 cm lang und hatten einen Durchmesser von 1,5 mm (Abb. 3).



A



B

Abbildung 3: Titanimplantat (A) und Kollagenimplantat (B)

AgNP

Die AgNP stammten von der Firma rent a scientist® GmbH (Regensburg, Deutschland). Die Integration der AgNP in die Osteosynthesematerialien erfolgte bei der Firma aap Biomaterials GmbH (Dieburg, Deutschland). Die Größe der AgNP in der Beschichtung der Osteosynthesematerialien betrug ~15 nm. Die Dotierung der Knochenersatzmaterialien erfolgte mittels einer AgPURE W50 Nano-Ag-Dispersion (rent a scientist® GmbH).

PMMA-Knochenzementimplantate

Die Knochenzemente bestanden aus PMMA, das in ausgehärteter Form implantiert wurde. Die PMMA-Zementimplantate wurden mit 4000 µg AgNP/g Zement (Gruppe 1 und 7) oder mit AgNP und Gentamicinsulfat (Antibiotikum zur Infektionsprophylaxe, 1,34 %) (Gruppe 2 und 8) dotiert.

Titanimplantate

Die Titanimplantate (Abb. 3A) bestanden aus Rohtitan (TiAl6V4-ELI). Die Bearbeitung der Titanoberfläche beruhte auf einer plasmaelektrolytischen Oxidation. Dabei enthielt das Elektrolyt 0% (Kontrolle, Gruppe 3 und 9) oder 5% AgNP (Gruppe 4 und 10). Die Beschichtung mit AgNP sollte eine Keimbesiedlung intra- bzw. postoperativ verhindern.

Kollagenimplantate

Die Kollagenvlieseimplantate waren resorbierbare Kollagenzylinder aus Kollagen Typ I (Abb. 3B), deren Trägermaterial mit 4000 µg AgNP/g Kollagen dotiert wurde (Gruppe 5 und 11). Wie bei den Titanimplantaten bildeten Kollagenimplantate ohne AgNP eine Kontrollgruppe (Gruppe 6 und 12).

Die Versuchstiere wurden nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen (Gruppe 1–6) oder 6 Monate (Gruppe 7–12) euthanasiert und analysiert. Die folgende Tabelle 1 zeigt die 12 Versuchsgruppen mit den verschiedenen Implantatzusammensetzungen und Standzeiten.

Tabelle 1: Versuchsgruppen; pro Gruppe: n=6

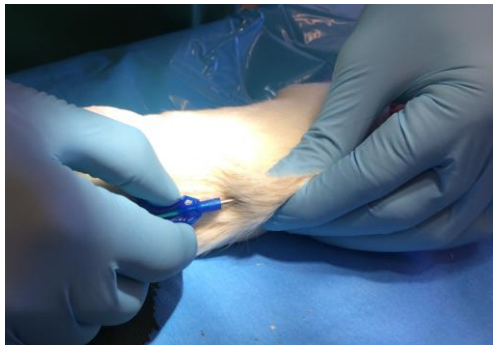
Implantat	Standzeit	
	4 Wochen	6 Monate
PMMA-Zementimplantat mit AgNP	Gruppe 1	Gruppe 7
PMMA-Zementimplantat mit Gentamicin (1,34%) und AgNP	Gruppe 2	Gruppe 8
Titanimplantat (TiAl6V4-ELI) ohne AgNP	Gruppe 3	Gruppe 9
Titanimplantat (TiAl6V4-ELI) mit AgNP	Gruppe 4	Gruppe 10
Kollagenimplantat (Kollagen Typ I) mit AgNP	Gruppe 5	Gruppe 11
Kollagenimplantat (Kollagen Typ I) ohne AgNP	Gruppe 6	Gruppe 12

2.4 Operation

2.4.1 Vorbereitung und Narkose

Präoperativ erhielten die Ratten nach der Bestimmung des Körpergewichts (KG) subkutan das Analgetikum Buprenorphin in einer Dosis von 0,03 mg/kg KG. Nach einer ½ h wurde eine kurzzeitige Inhalationsnarkose mit Isofluran (4 %, Baxxter®, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere wurden auf eine beheizte Unterlage in Rückenlage gebracht. Die Haut wurde im Bereich des OP-Feldes am linken Bein mit einem Langhaarschneider und Einmalrasierer enthaart. Zusätzlich wurde eine Augensalbe (Liposic®, Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland) appliziert.

Die in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagerten Ratten erhielten weiter eine Inhalationsnarkose mit 2 %igem Isofluran. Die Überprüfung des Narkosezustands erfolgte durch den Zehenreflex. Mit einer 20 G Injektionsnadel wurde den Ratten ein Temperatur-Transponder (BioMedic Data Systems, Inc., Seaford, Delaware, USA) subkutan eingesetzt (Abb. 4A). Darüber konnten mit einem speziellen Lesegerät (BioMedic Data Systems, Inc., Seaford, Delaware, USA), das über die Applikationsstelle gehalten wurde, die Tiere identifiziert und die Körpertemperatur postoperativ kontrolliert werden (Abb. 4B).



A



B

Abbildung 4: Applikation des Temperatur-Transponders (A) und Ablesung der Körpertemperatur (B)

Das linke Bein der Ratten wurde mit einer 10%igen Polovidon-Jod-Lösung desinfiziert. Danach wurde die Ratte mit einem Angio-Brachial-Lochtuch steril abgedeckt, sodass das OP-Feld am linken Bein zugänglich blieb (Abb. 5). Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden bei den Eingriffen sterilen OP-Kittel, OP-Hauben, Mundschutz und Handschuhe getragen.



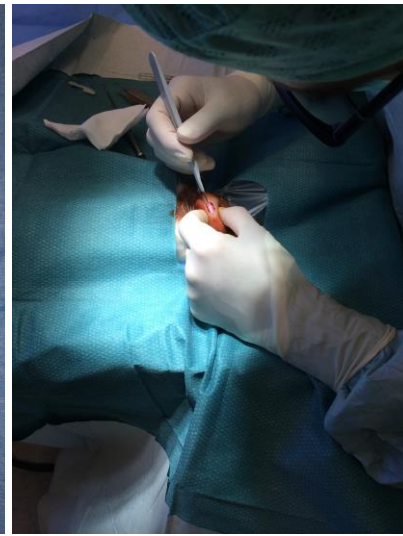
Abbildung 5: Operationssitus an der linken Tibia

2.4.2 Implantation der Knochenersatzmaterialien

Für die Implantation des Knochenersatzmaterials in den proximalen Unterschenkel wurde als Zugang in den intramedullären Kanal der Tibia eine 0,5 cm lange Hautinzision über der *Tuberositas tibiae* vorgenommen (Abb. 6B). Mit Hilfe eines 11er Skalpells wurde eine Einbuchtung der Kortikalis erzeugt, um die anschließende Bohrung durchführen zu können.



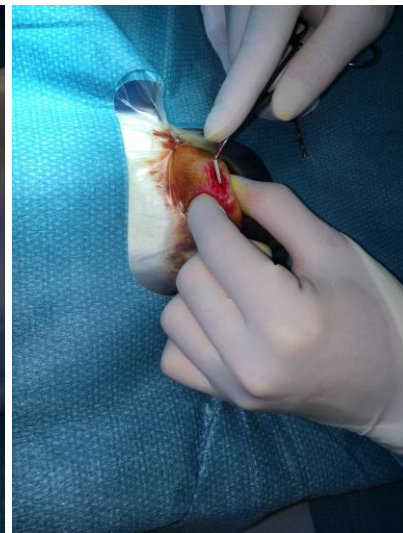
A



B



C



D

Abbildung 6: *Implantation des Knochenersatzmaterials*

A: OP-Instrumente; B: Hautinzision an der Tuberositas tibia; C: Bohrung des Tibia Markkanals; D: Implantation des Kollagenzylinders

Anschließend wurde der 1,5 mm breite Spiralbohrer an der kleinen Einbuchtung angesetzt, der Tibia-Markkanal vorsichtig aufgebohrt (Abb. 6C) und das 2 cm lange und 1,5 mm breite Implantat in den Markkanal der Tibia eingesetzt (Abb. 6D). Die Größe der Implantate ließ kein Verschieben innerhalb des Markkanals zu. Das Implantat reichte bis ins distale Ende der Tibia oberhalb des Sprunggelenks. Die Zement- und Titanimplantate wurden mit der Hand eingesetzt, um eine Beschädigung der Oberfläche durch die Instrumente zu vermeiden. Bei den Kollagenzylindern wurde ein Applikator verwendet.

Am Ende der OP wurde die Wunde mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl 4.0) per Einzelknopfnäht zugenäht und mit etwa fünf Wundklammern verschlossen. Ein Wundsprühpflaster auf der Naht sollte eine Kontamination durch Kratzen oder Lecken der Wunde verhindern.

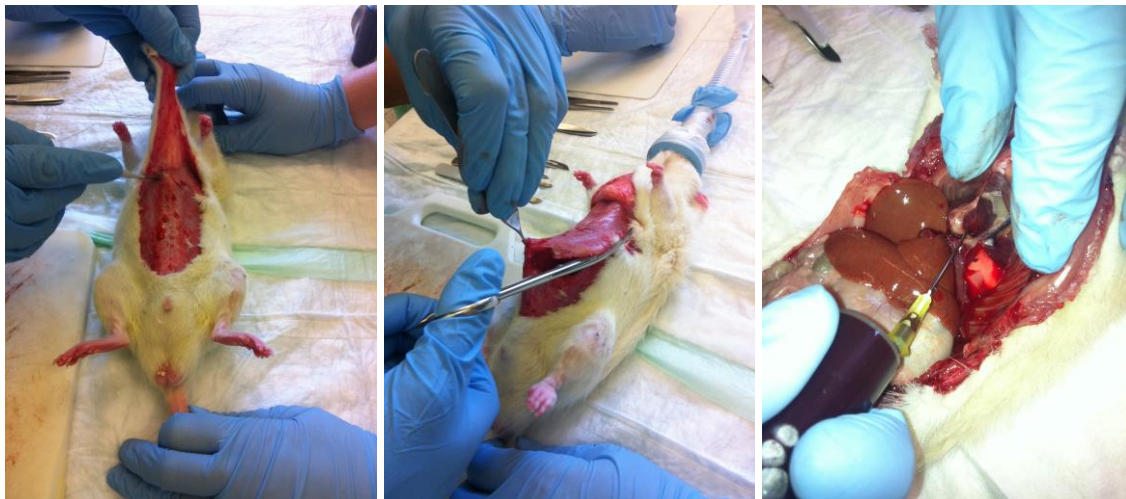
2.4.3 Postoperative Nachsorge

Nachdem die Tiere ihr Bewusstsein wiedererlangt hatten, wurden sie in den ersten sieben Tagen postoperativ in Makrolonkäfigen vom Typ III auf Zellstoff einzeln gehalten. Diese Maßnahme sollte verhindern, dass Granulatsplitter von der Einstreu in die Wunde gelangen und sich die Tiere durch gegenseitiges Benagen verletzen bzw. kontaminieren. Zur Schmerzreduktion erhielten die Ratten Metamizol (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) ins Trinkwasser eingemischt (Metacam® 5 ml/l Wasser). Als Analgetikum bekamen die Tiere in den ersten drei Tagen alle 12 h Buprenorphin 0,01–0,05 mg/kg subkutan verabreicht. Ab dem achten Tag nach der OP wurden die Ratten zu viert in Makrolonkäfige Typ IV unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.1) gehalten. Postoperativ wurden verschiedene physiologische Parameter der Tiere jeden Tag mit Hilfe von Scoring Sheets analysiert und dokumentiert. Dazu zählten Verhalten, Aussehen, Gewicht, Atmung, Rektumprolaps, Automutilation und potentielle Infektionen. Zu den Infektionszeichen gehörte eine Rötung oder Schwellung am Unterschenkel. Bei definierten Abweichungen von der Norm, erfolgte eine tierärztliche Untersuchung. Da bei keinem der Tiere systemische Krankheitszeichen oder ein postoperativer Gewichtsverlust von mehr als 10% des Ausgangswertes vor der OP festgestellt wurde, musste keine vorzeitige Euthanasie durchgeführt werden.

2.5 Euthanasie

2.5.1 Vorbereitung und Narkose

Nach einer Standzeit von 4 Wochen bzw. 6 Monaten wurden die Ratten getötet. Dazu erfolgte zunächst eine Injektionsnarkose mit Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (5 mg/kg KG). Vor der Tötung wurde wie bei der Implantations-OP eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Anschließend wurde die Ratte in Rückenlage auf den OP-Tisch gelegt und die Hautschichten des Abdomens mit der Schere aufgeschnitten (Abb. 7A). Die Präparation erfolgte bis zum *Processus xiphoideus* (Abb. 7B). Der Schwertfortsatz wurde angehoben, um eine verbesserte Sicht ins Thoraxinnere zu ermöglichen. Die Tötung geschah durch eine Herzpunktion, indem eine Kanüle (20 G) in den rechten Ventrikel des Herzens eingebracht wurde. Die Entblutung der Tiere erfolgte unter langsamer Aspiration (Abb. 7C).



A

B

C

Abbildung 7: Euthanasie

A: Präparation der Bauchhaut; **B:** Eröffnung des Abdomens; **C:** Herzpunktion

2.5.2 Probenentnahme

Für die weitere Untersuchung wurden die Tibiae mit den Implantaten entnommen. Dazu wurden vorsichtig mit einem Skalpell Haut und Muskeln makroskopisch abpräpariert

und das umliegende Gewebe komplett entfernt, bis ausschließlich das Periost zu sehen war. Die Knochen wurden mit einer Bandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) in 3 mm dünne Scheiben gesägt (Abb. 8).

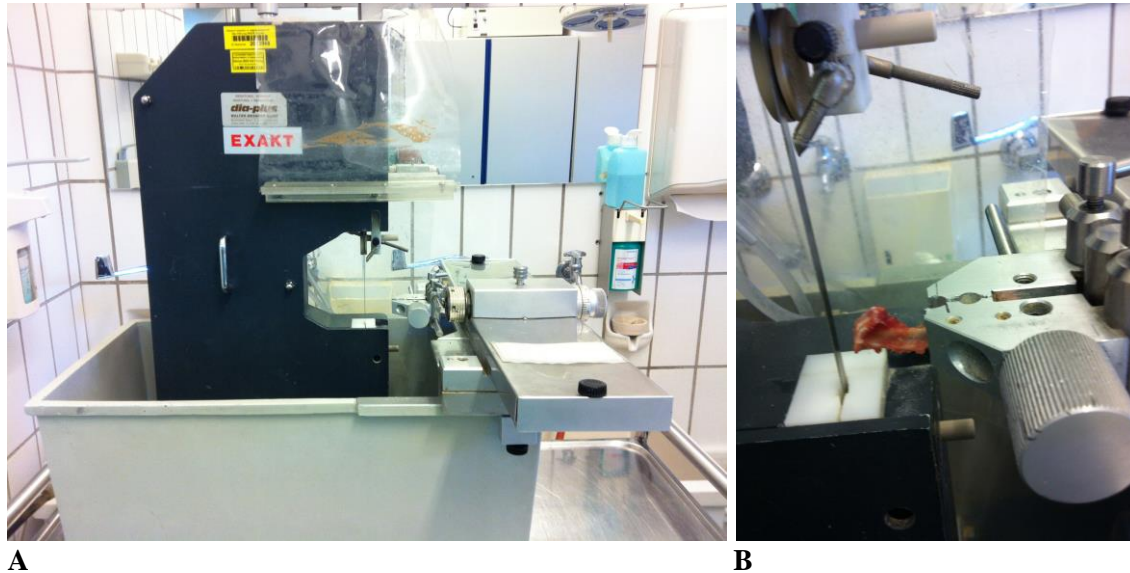


Abbildung 8: *Anfertigung der Tibia-Schnitte*

A: Bandsäge; B: Sägen der proximalen Tibia links

2.6 Probenaufbereitung

2.6.1 Fixation und Entkalkung

Die Knochenschnitte wurden zunächst 24 h in 4% Paraformaldehydlösung im Kühlschrank fixiert und im Anschluss sechs Mal mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2–7,4 gespült. Für die weitere Verarbeitung wurden die Proben entkalkt. Dazu wurden sie in Einbettungskapseln in eine 10% Ethyldiamin-tetraessigsäure-(EDTA)-Lösung gelegt. Die EDTA-Lösung bestand aus 3,4% Tris-Base (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 10% Titriplex III (Merck, Darmstadt, Deutschland) in destilliertem Wasser (*Aqua dest*). Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl auf 7,0–7,4 eingestellt. Der 17 Tage dauernde Entkalkungsprozess erforderte einen

Wechsel der EDTA-Lösung alle zwei Tage. Nach der Entkalkung wurden die Proben 1 h mit Leitungswasser gespült.

2.6.2 Paraffineinbettung und Schnitterstellung

Die Proben wurden in den Paraffin-Einbettautomaten (TP 1050, Leica, Wetzlar, Deutschland) gelegt und in aufsteigender Ethanolreihe entwässert (Tab. 2)

Tabelle 2: Paraffineinbettung (h: Stunden, min: Minuten, RT: Raumtemperatur)

Station	Lösung	Dauer	Temperatur
1	70% Ethanol	2 h	RT
2	80% Ethanol	2 h 30 min	RT
3	96% Ethanol	2 h	RT
4	100% Ethanol	3 h	RT
5	100% Ethanol	3 h	RT
6	100% Ethanol	3 h	RT
7	Xylol	1 h	RT
8	Xylol	45 min	RT
9	Xylol	45 min	RT
10	Paraffin	40 min	58 °C
11	Paraffin	40 min	58 °C
12	Paraffin	40 min	58 °C

In dem Einbettautomaten wurde ein wechselnder Zyklus aus Druck und Vakuum erzeugt, der sich alle 4 min wiederholte. Die Kammer wurde 90 Sekunden auf einen Druck von -70 kPa eingestellt, dann 30 Sekunden belüftet, anschließend 90 Sekunden auf einen Druck von 35 kPa eingestellt und dann wiederum 30 Sekunden belüftet. Die Proben wurden nach der Einbettung mit dem Rotationsmikrotom (RM 2155, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 5 µm dünne Schnitte geschnitten.

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Zuerst wurden die Paraffinschnitte für die HE-Färbung entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger für jeweils 5 min hintereinander in zwei Behälter mit Xylol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gesetzt. Anschließend wurden die Objektträger in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 70%, *Aqua dest*) für jeweils 2–5 min gespült. Die Kernfärbung erfolgte für 3–6 min mit filtriertem Hämalaun (Mayers Hämalaun, Merck), dass anschließend mit *Aqua dest* abgespült wurde. Nach dem zehnminütigen Bläuen unter fließendem Leitungswasser wurde wiederum mit *Aqua dest* gespült. Nach der 40-sekündigen Bindegewebsfärbung in 1%iger Eosinlösung wurden die Schnitte erneut mit *Aqua dest* gespült. Nach der Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol für jeweils 2–5 min und zweimal mit Xylol für jeweils 5 min entwässert. Die Eindeckung erfolgte mit DePex (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). In den Schnitten waren die Kerne durch die Färbung blau, die Muskulatur rot, das Bindegewebe hellrot und Erythrozyten leuchtend rot markiert.

2.6.4 Enzymhistochemie

2.6.4.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

TRAP ist ein Enzym, das in größeren Mengen durch Osteoklasten sezerniert wird. Daneben wird es aber auch von inflammatorischen Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet. Die TRAP-Färbung wird zumeist als Marker für Osteoklasten verwendet.

Für die Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (Xylol 2–5 min; absteigende Ethanolreihe aus 100%, 96%, 70% Ethanol jeweils 5 min, *Aqua dest* 2 x 5 min). Im Anschluss erfolgte eine Spülung mit 0,1 M Natriumacetat-Puffer bei einem pH-Wert von 5,2 für 10 min. Für die Färbung wurden zwei Lösungen hergestellt. Für die erste Lösung wurden 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat in 125 µl N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gegeben. Die zweite Lösung bestand aus 57,5 mg Natriumtartrat (di-Natriumtartrat-Dihydrat, Merck) in 1 ml

0,1 M Natrium-Acetat. Im Anschluss wurden beide Färbelösungen mit 25 ml 0,1 M Natriumacetat (pH=5,2) gemischt. Die fertige Färbelösung wurde filtriert. Die Inkubation der Schnitte mit der Färbelösung fand in einer Kammer bei 37 °C für 12–30 Sekunden statt. Dabei wurde die Färbeintensität regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft. Nach der Inkubation wurde der Objektträger abgeklopft und 3 x mit *Aqua dest* gespült. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Shandon Inc, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) für 2 min und einer anschließenden kurzen Spülung der Schnitte in *Aqua dest* gehalten. Nach einer weiteren Spülung mit *Aqua dest* wurden die Schnitte mit vorher im Wasserbad bei 45 °C verflüssigter Kaisers' Glyceringelatine (Merck) eingedeckt.

2.6.4.2 Alkalische Phosphatase (ALP)

Der Nachweis der Osteoblasten erfolgte über die enzymhistochemische Darstellung der ALP. Für die Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (Xylol 2–5 min; absteigende Ethanolreihe aus 100%, 96%, 70% Ethanol jeweils 5 min, *Aqua dest* 2 x 5 min). Anschließend wurden die Schnitte einmal 10 Sekunden lang mit 0,1 M Tris-Puffer (pH=9,4; Trizma Base, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gespült. Für die Färbung wurde ein fertiges Phosphatase-Substrat verwendet (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA). Die Färbelösung wurde in Spritzen aufgefüllt und durch einen Millipore-Filter auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde der Objektträger abgeklopft, dreimal mit *Aqua dest* gespült, mit der Fertiglösung Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Carl Roth GmbH) für 10 min gegengefärbt und erneut dreimal mit *Aqua dest* gespült. Nach der Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 96%, 100% Ethanol für jeweils 5 min, zweimal Xylol für 5 min) wurden die Schnitte mit DePex (VWR International GmbH) luftdicht eingedeckt.

2.7 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ist eine quantitative Methode zur Bestimmung von Gewebeflächen, der Zusammensetzung von Oberflächen, der Zellzahl und der Zellgröße. Die Daten der histologischen Präparate werden in Zahlen transformiert und können so miteinander verglichen werden.

Die HE-Präparate wurden mit dem 5er-Objektiv und die Objektträger für den Nachweis von TRAP und ALP mit dem 10er-Objektiv des Lichtmikroskops (Axioplan 2 mit Fotomodul Axiophot 2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) fotografiert (Kamera DC500, Leica Microsystems Ltd, Glattbrugg, Schweiz; Software: Leica IM1000 v. 4.0, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, Großbritannien). Die Fotografien wurden anschließend mit der Software Adobe Photoshop CC (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) auf dem Apple MacBook (Mac OS X, Version 10.6.8) zusammengesetzt und weiterverarbeitet. Die Daten wurden in Microsoft Excel exportiert.

Für die histomorphometrische Untersuchung wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Die erste Untersuchung diente der Messung des Anteils der Knochenfläche [%] (Abb. 9). Für die Berechnung mit der Software Adobe Photoshop CC wurde die rot gefärbte Fläche der Knochen trabekel innerhalb der Spongiosa bestimmt, indem die relevanten Trabekelflächen manuell mit dem Cursor markiert wurden. Zusätzlich wurde die Fläche der Spongiosa gemessen und die Fläche des Implantatlochs bzw. des Granulationsgewebes davon subtrahiert. Aus der Relation der Fläche der Knochen trabekel und der Fläche der Spongiosa ergab sich der Knochenflächenanteil. Die mathematische Gleichung sieht wie folgt aus:

$$x = \left(\frac{a}{b-c} \right) \times 100$$

x: Anteil der Knochenfläche [%] b: Fläche der Spongiosa

a: Trabekelfläche c: Implantatloch bzw. Granulationsgewebe

Im Anschluss wurden die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler (SEM) für weitere Berechnungen ermittelt.

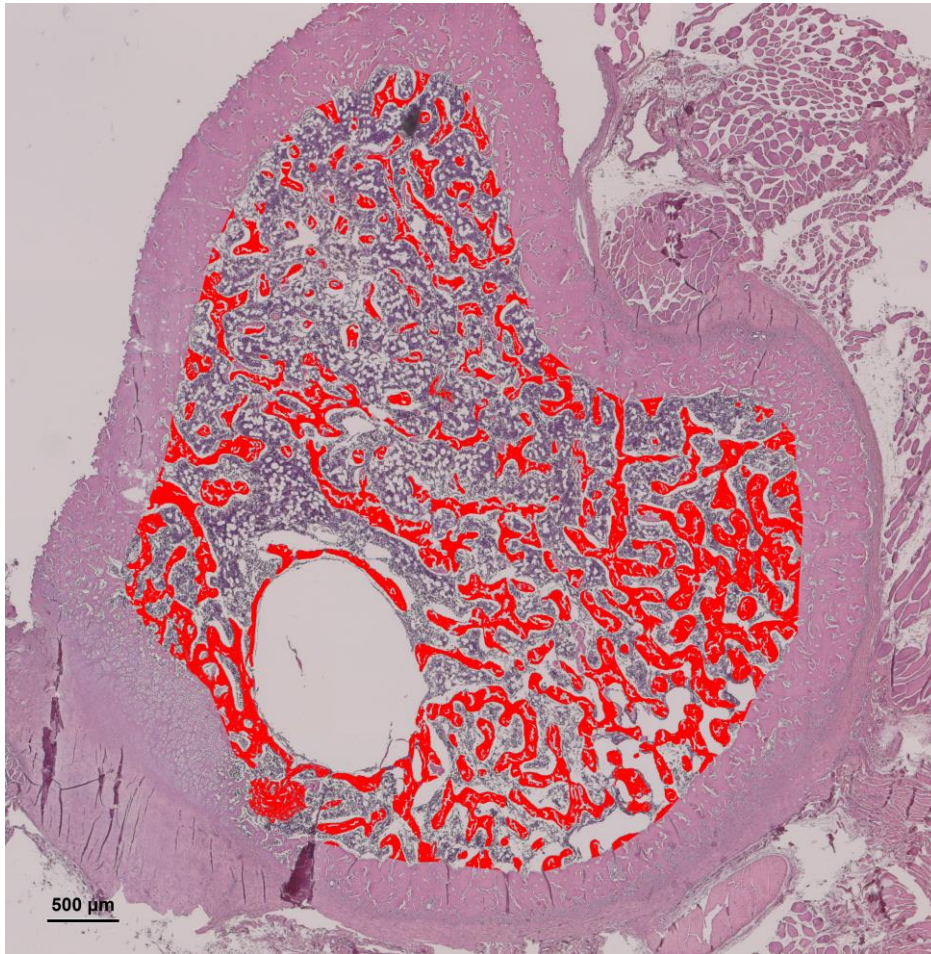


Abbildung 9: HE-Aufnahme eines Querschnitts durch die Tibia mit dem Implantat zur Berechnung des Knochenflächenanteils

Die rot-markierte Fläche entspricht den Trabekeln innerhalb der Spongiosa.

Die zweite Untersuchung diente der Berechnung des Anteils der Knochenneubildung. Dafür wurde zunächst der Mittelpunkt des Implantatlochs bzw. Granulationsgewebe ermittelt und eine *region of interest* (ROI) in Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 1200 Pixel-Einheiten definiert (Abb. 10).

Für die Berechnung wurde die rot gefärbte Fläche der Knochen trabekel innerhalb der ROI bestimmt. Ebenso wurde die Fläche des Implantatlochs bzw. Granulationsgewebes von der einheitlich festgelegten Fläche der ROI subtrahiert. Eine eventuell vorhandene Schnittmenge der ROI und der Kortikalis, wie die bunt-schraffierte Fläche in Abbildung 10, wurde von der ROI subtrahiert. Aus der Relation der Fläche der Knochen trabekel und der Fläche der ROI ergab sich der Anteil der Knochenneubildung. Die mathematische Gleichung sieht wie folgt aus:

$$x = \left(\frac{a}{(b-d)-c} \right) \times 100$$

x: Anteil der Knochenneubildung [%]

a: Trabekelfläche

b: Fläche der ROI

c: Implantatloch bzw. Granulationsgewebe

d: Artefakt

Im Anschluss wurden die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler (SEM) für weitere Berechnungen ermittelt.

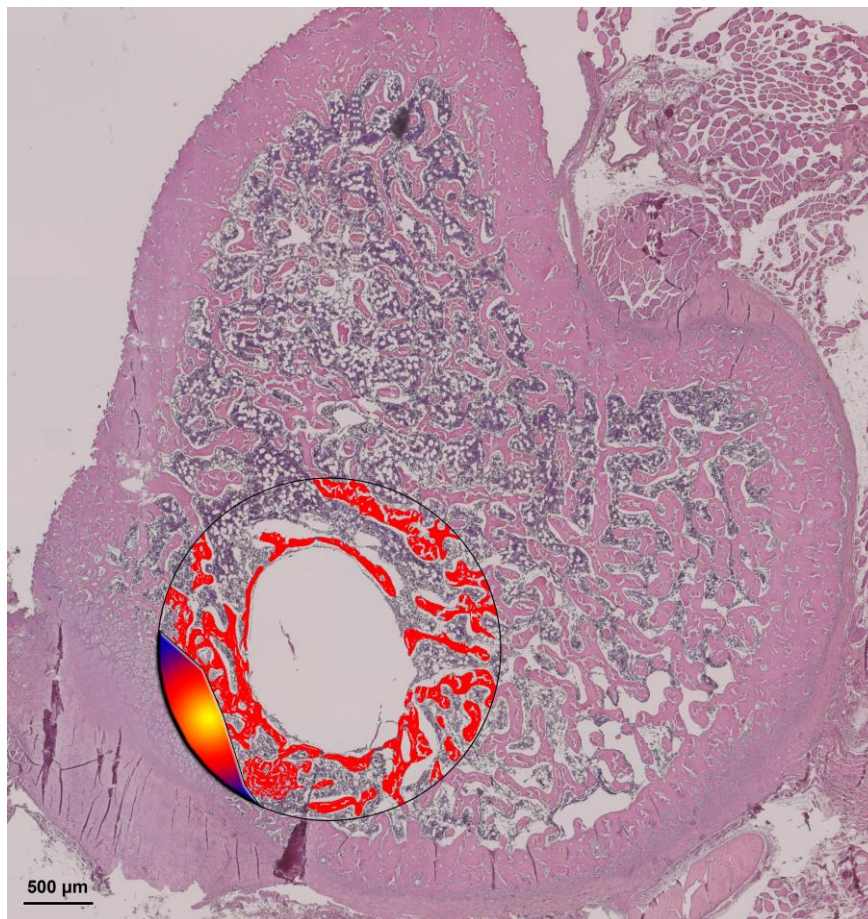


Abbildung 10: HE-Aufnahme eines Querschnitts durch die Tibia mit dem Implantat zur Berechnung der Knochenneubildung

Die Rot-markierte Fläche entspricht den Trabekeln innerhalb der ROI; die bunt-schraffierte Fläche kennzeichnet ein Artefakt.

Für den Nachweis der TRAP-positiven Zellen im Bereich der Implantatstelle wurde der Defektbereich (die Stelle, an der sich zuvor das Implantat befand) mit dem 10er Objektiv des Lichtmikroskops fotografiert. Die Fotografie-Serien wurden mit der Software Adobe Photoshop CC zusammengesetzt. Eng um die Implantatstelle wurde eine ROI definiert. Da die Implantate einen Durchmesser von 1,5 mm besaßen und das Programm diese Strecke mit 1402,5 Pixel notiert, wurde die ROI um 300 Pixel erweitert. Daher war der Durchmesser der ROI mit 1702,5 Pixel determiniert.

Danach wurde die Gesamtoberfläche der Knochentrabekel (Abb. 11) innerhalb der ROI mit dem Programm Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc, Rockville, Maryland, USA) quantifiziert. Mit dem 100er Objektiv des Lichtmikroskops wurden die TRAP-positiven Zellen ausgezählt. Die TRAP-positiven Zellen, die am Knochentrabekel lokalisiert waren und zugleich $3 \geq$ Zellkerne besaßen, wurden als Osteoklasten definiert.

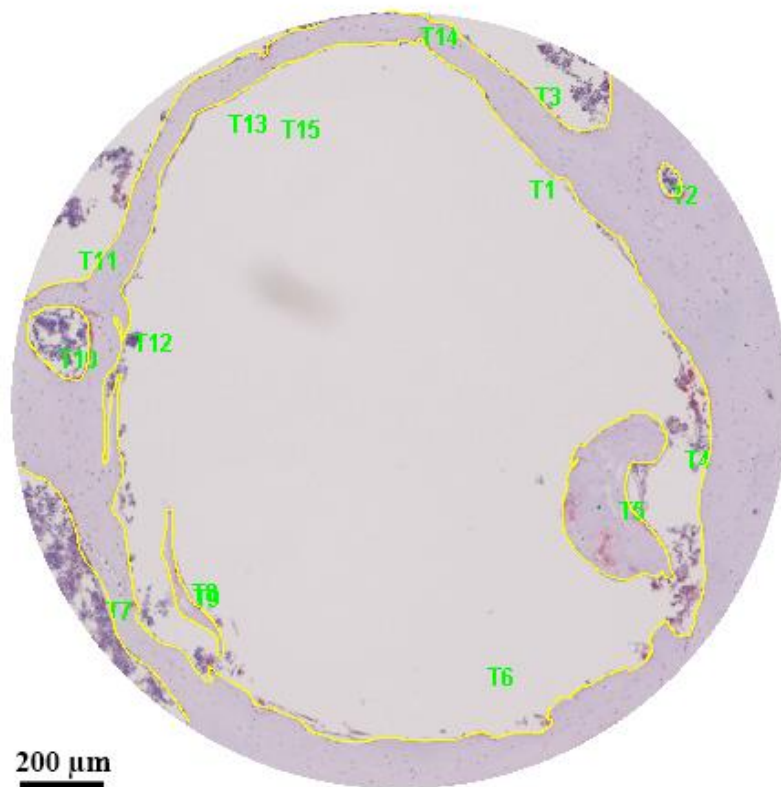


Abbildung 11: TRAP-Aufnahme einer ROI um die Implantatstelle – Nachweis der Osteoklasten

Die gelb markierte Fläche zeigt die Oberfläche der Knochentrabekel innerhalb der ROI.

Für die Identifikation der ALP-positiven Zellen wurde der Defektbereich mit dem 10er Objektiv fotografiert. Die Fotografie-Serien wurden mit Adobe Photoshop CC

zusammengefügt. Wie beim Nachweis von TRAP-positiven Zellen wurde eine ROI mit 1702,5 Pixel festgelegt. Mit dem Programm Image Pro Plus wurde die Oberfläche der Knochentrabekel innerhalb der ROI (Abb. 12A) und die Oberfläche der Knochentrabekel mit ALP-positiven Zellen bestimmt (Abb. 12B).

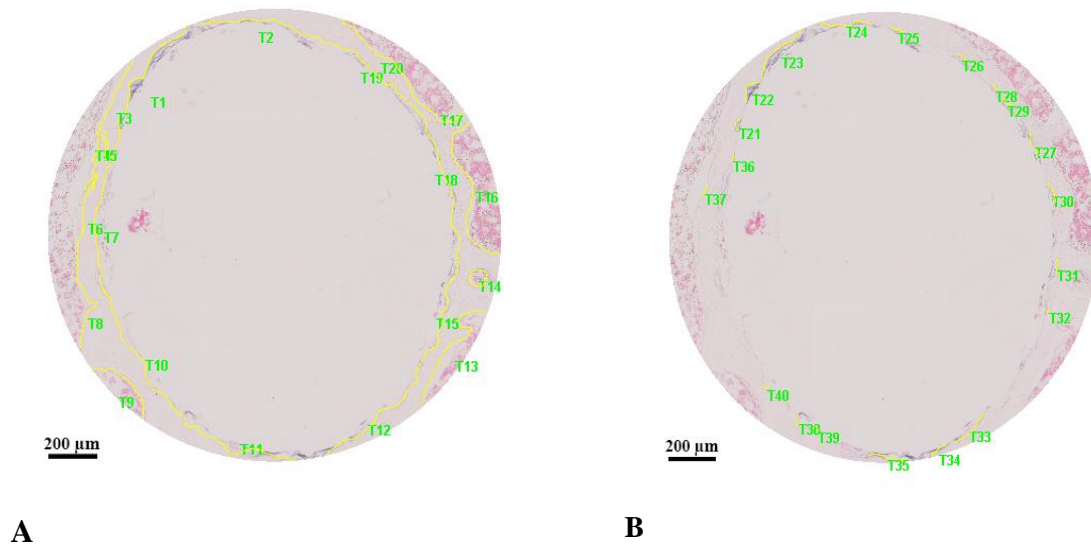


Abbildung 12: ALP Aufnahme einer ROI um die Implantatstelle – Nachweis der ALP-positiven Trabekeloberflächen

A: Die gelb markierte Fläche illustriert die Oberfläche der Knochentrabekel

B: Die gelb markierte Fläche illustriert die Oberfläche der Knochentrabekel mit ALP-positiven Zellen.

2.8 Statistische Auswertung der Daten

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung der Parameter der HE-Aufnahmen wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Parameter mit signifikant verschiedenen Ergebnissen zwischen den Gruppen wurden anschließend mit dem Mann-Whitney-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05^*$ festgelegt. Bei den Daten der TRAP- und ALP-positiven Zellen wurden vor dem Kruskal-Wallis-Test bzw. Mann-Whitney-Test zur Überprüfung der

Normalverteilung ein Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden auf $p \leq 0,05^*$ (signifikante Unterschiede) bzw. $p \leq 0,01^{**}$ (hochsignifikante Unterschiede) festgelegt. Die Verteilung der Daten in den Gruppen wurde grafisch in Form von Box-Plots dargestellt. Die Box gibt den Interquartilsabstand wieder und definiert den Wertebereich zwischen dem 25%- und 75%-Perzentil. Werte mit einer 1,5–3-fachen Boxhöhe außerhalb des Interquartilsabstandes wurden als Ausreißer (°) gewertet. Extremwerte (☆) lagen um mehr als das Dreifache der Boxhöhe vom Interquartilsabstand entfernt.

3 Ergebnisse

3.1 Histomorphometrische Auswertung

3.1.1 Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

Die Versuchstiere mit einer Standzeit des Implantates von 4 Wochen zeigten bei den postoperativen Kontrollen unauffällige Werte. Keines der Tiere litt in dem Zeitraum an einer systemischen Infektion oder zeigte Anzeichen von Komplikationen. Abbildung 13 zeigt den Anteil der Knochenfläche [%] in den Gruppen 1–6.

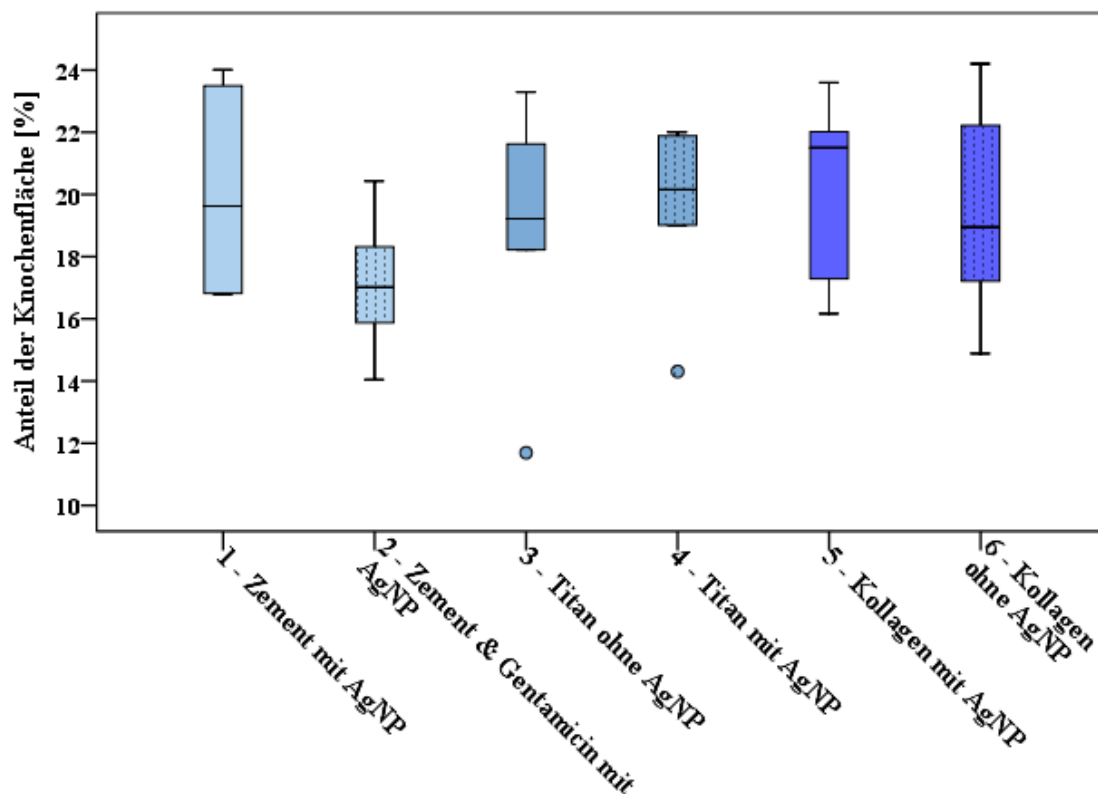


Abbildung 13: Anteil der Knochenfläche der Tibia bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

Die Daten stammen von insgesamt $n=36$ Tiere, d. h. 6 Tiere pro Gruppe. ° Ausreißer (Gruppe 3: 11,69 %; Gruppe 4: 14,31 %)

Der Anteil der Knochenflächen war in allen Gruppen vergleichbar. Lediglich die Tiere der Gruppe 2 schienen einen geringeren Knochenflächenanteil zu besitzen. Der Kruskal-Wallis-Test ergab keine signifikanten Unterschiede ($p=0,514$) zwischen den sechs Gruppen. Die mittleren Rangplatzsummen stimmten bis auf Gruppe 2 mit 10,83 weitgehend über (Tab. 3).

Tabelle 3: Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

Variable	N	Mittlerer Rang	Mittelwert [%]
Gruppe 1	6	21,00	20,06 %
Gruppe 2	6	10,83	17,12 %
Gruppe 3	6	18,33	18,88 %
Gruppe 4	6	20,00	19,58 %
Gruppe 5	6	21,83	20,35 %
Gruppe 6	6	19,00	19,4 %
Σ	36		

3.1.2 Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Die Versuchstiere mit einer Standzeit des Implantates von 6 Monaten zeigten bei den postoperativen Kontrollen ebenfalls unauffällige Werte. Abbildung 14 zeigt den Anteil der Knochenfläche [%] in den Gruppen 7–12.

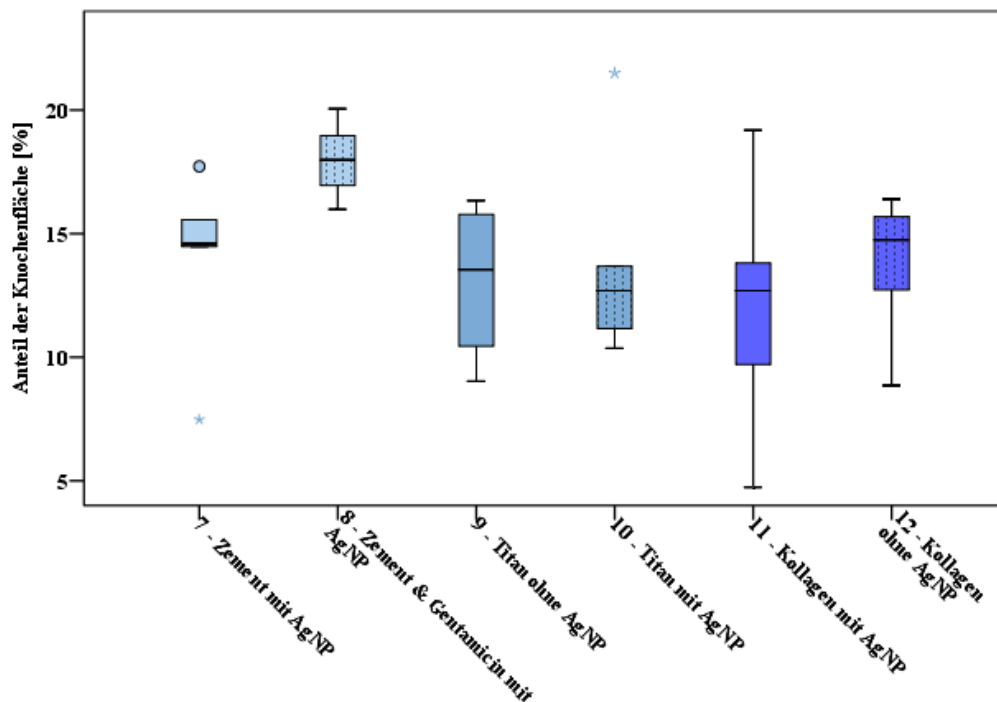


Abbildung 14: Anteil der Knochenfläche der Tibia bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Die Daten stammen von insgesamt $n=36$ Tiere, d. h. 6 Tiere pro Gruppe.

° Ausreißer (Gruppe 7: 17,72 %); ☆Extremwerte (Gruppe 7: 7,48 %; Gruppe 10: 21,5 %)

Der Anteil der Knochenflächen war in allen Gruppen vergleichbar, zeigte aber in den Gruppen eine unterschiedlich ausgeprägte Streuung. Lediglich die Tiere der Gruppe 2 schienen einen höheren Knochenflächenanteil zu besitzen. Für den Kruskal-Wallis-Test wurden aus der Gruppe 7, 8 und 10 jeweils eine Messung und aus der Gruppe 9 zwei Messungen aufgrund großflächiger Artefakte, unter anderem im Implantatbereich, herausgenommen. Die Gruppen 11 und 12 waren mit jeweils $n=6$ vollständig. Bei einer Gesamtanzahl von $n=31$ Tieren gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Knochenfläche in den verschiedenen Gruppen ($p=0,125$). Die mittleren Ränge (Tab. 4) waren auch hier, wie bei den Tieren mit einer vierwöchigen Standzeit der Implantate, relativ konform bis auf Gruppe 8 (PMMA-Zementimplantat mit Gentamicin und AgNP) mit einem klaren Anstieg des mittleren Rangs von 10,83 auf 26,40. Die Tiere der Gruppe 8 zeigten mit durchschnittlich 17,99% einen deutlich größeren Knochenflächenanteil im Vergleich zu den Tieren der anderen Gruppen mit einer

sechsmonatigen Standzeit der Implantate (12,14–13,96%). Zudem war die Varianz in Gruppe 8 relativ gering.

Tabelle 4: Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Variable	N	Mittlerer Rang	Mittelwert [%]
Gruppe 7	5	15,80	13,96 %
Gruppe 8	5	26,40	17,99 %
Gruppe 9	4	13,50	13,12 %
Gruppe 10	5	13,40	13,88 %
Gruppe 11	6	11,67	12,14 %
Gruppe 12	6	15,67	13,86 %
Σ	31		

3.1.3 Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

Abbildung 15 zeigt den Anteil der Knochenneubildung am Interface bei den Versuchstieren nach einer vierwöchigen Standzeit der Implantate.

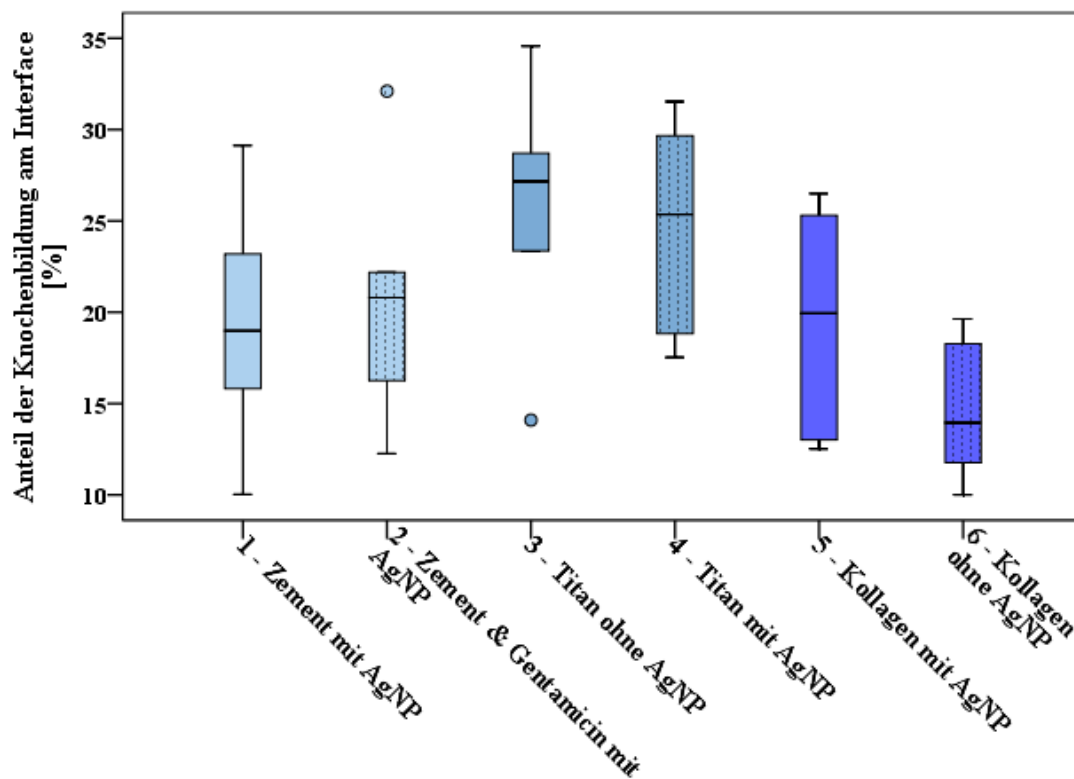


Abbildung 15: Anteil der Knochenbildung am Interface bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

Die Daten stammen von insgesamt $n=36$ Tiere, d. h. 6 Tiere pro Gruppe. ° Ausreißer (Gruppe 2: 32,10 %; Gruppe 3: 14,10 %)

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte mit einem $p=0,047$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die Knochenneubildung. Die zugehörigen mittleren Ränge sind Tabelle 5 zu entnehmen. Hier fiel der mit 8,33 niedrige Wert in Gruppe 6 (Kollagenimplantate ohne AgNP) auf. Die Tiere zeigten mit durchschnittlich 14,6% die geringste Knochenneubildung. Die höchste Knochenneubildung am Interface trat bei den Tieren mit Titanimplantaten auf, wobei die Spannweite (oberen Whisker – unterer Ausreißer in Gruppe 3: Implantat Titan ohne AgNP) relativ groß war.

Tabelle 5: Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

Variable	N	Mittlerer Rang	Mittelwert [%]
Gruppe 1	6	16,17	19,36 %
Gruppe 2	6	18,67	20,73 %
Gruppe 3	6	26,00	25,84 %
Gruppe 4	6	24,83	21,79 %
Gruppe 5	6	17,00	19,54 %
Gruppe 6	6	8,33	14,6 %
Σ	36		

Ein Vergleich der Knochenneubildung zwischen den Gruppen mit dem gleichen Implantatmaterial mit dem Mann-Whitney-Test ergab keine signifikanten Unterschiede (PMMA-Zementimplantate mit AgNP / mit AgNP + Gentamicin $p=0,818$; Titanimplantate \pm AgNP $p=0,937$; Kollagenimplantat \pm AgNP $p=0,132$).

3.1.4 Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Abbildung 16 zeigt den Anteil der Knochenneubildung am Interface bei den Versuchstieren nach einer sechsmonatigen Standzeit der Implantate.

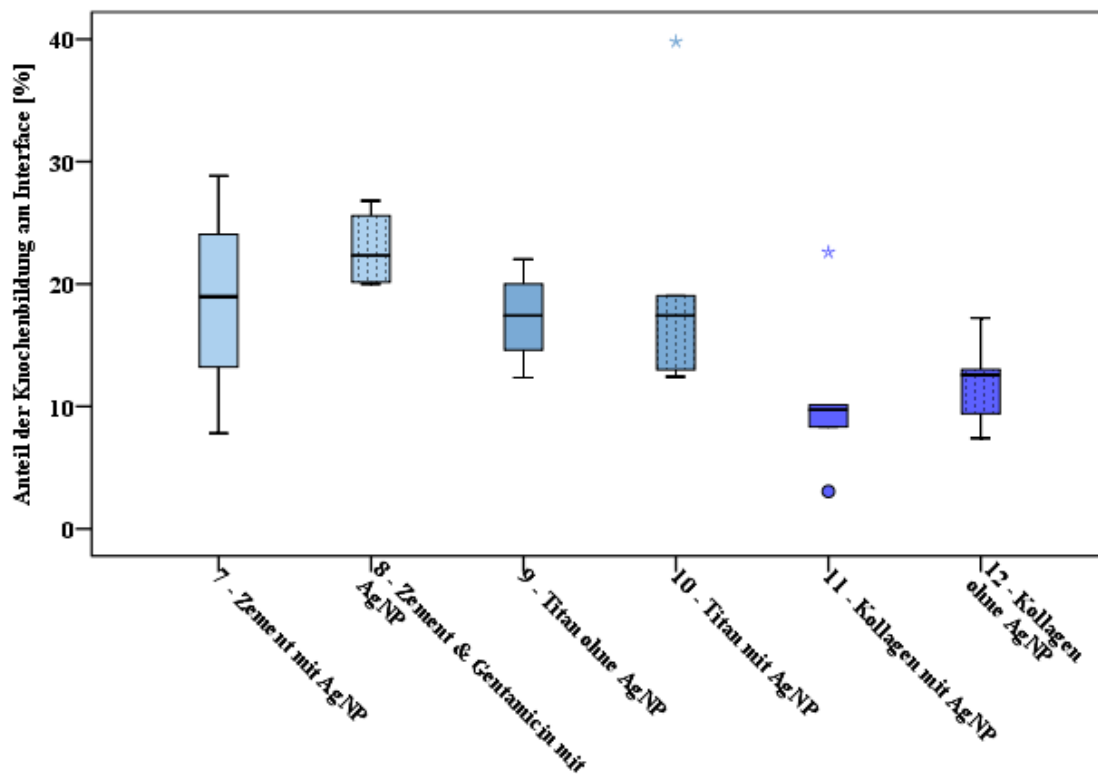


Abbildung 16: Anteil der Knochenbildung am Interface bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Die Daten stammen von insgesamt $n=36$ Tiere, d. h. 6 Tiere pro Gruppe. ° Ausreißer (Gruppe 11: 3,05 %), ☆Extremwerte (Gruppe 10: 39,81 %; Gruppe 11: 22,6 %)

Der Box-Plot zeigt eine homogene Knochenneubildungsrate mit relativ niedriger Streuung in den meisten Gruppen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den Gruppen 1–6 bestand zwischen den Gruppen 7–12 kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,069$; Kruskal-Wallis-Test). In Tabelle 6 sind die mittleren Ränge für die Gruppen 7–12 bei insgesamt $n=27$ Werten aufgelistet. Aus den Gruppen 7–9 wurden jeweils zwei Tiere und aus den Gruppen 10–12 jeweils ein Tier aufgrund der eingeschränkten Verwertbarkeit der Daten exkludiert, da jeweils ein großflächiges Artefakt im Implantatbereich bzw. kein sichtbarer Defekt im Sinne einer Implantatstelle zu verzeichnen war.

Tabelle 6: Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Variable	N	Mittlerer Rang	Mittelwert [%]
Gruppe 7	4	16,25	18,65 %
Gruppe 8	4	22,50	22,87 %
Gruppe 9	4	14,75	17,3 %
Gruppe 10	5	16,00	20,34 %
Gruppe 11	5	8,20	10,77 %
Gruppe 12	5	8,60	11,92 %
Σ	27		

Das durchschnittliche Ausmaß der Knochenneubildung am Interface nach einer sechsmonatigen Standzeit des Implantates war bei den Ratten mit Kollagenimplantaten im Vergleich zu den anderen Gruppen auffallend niedrig (Abb. 17). In Gruppe 11 (Implantat Kollagen mit AgNP) lag der Wert bei $10,77 \pm 3,22\%$ in Gruppe 12 (Implantat Kollagen ohne AgNP) bei $11,92 \pm 1,68\%$. Die anderen Gruppen mit PMMA-Zement- und Titanimplantaten wiesen unabhängig von der Dotierung eine höhere Knochenneubildungsrate auf. Den niedrigsten Mittelwert zeigte mit $17,30 \pm 1,99\%$ Gruppe 9 (Implantat Titan ohne AgNP) und den höchsten Mittelwert mit $22,87 \pm 1,64\%$ Gruppe 8 (PMMA-Zementimplantat mit Gentamicin und AgNP).

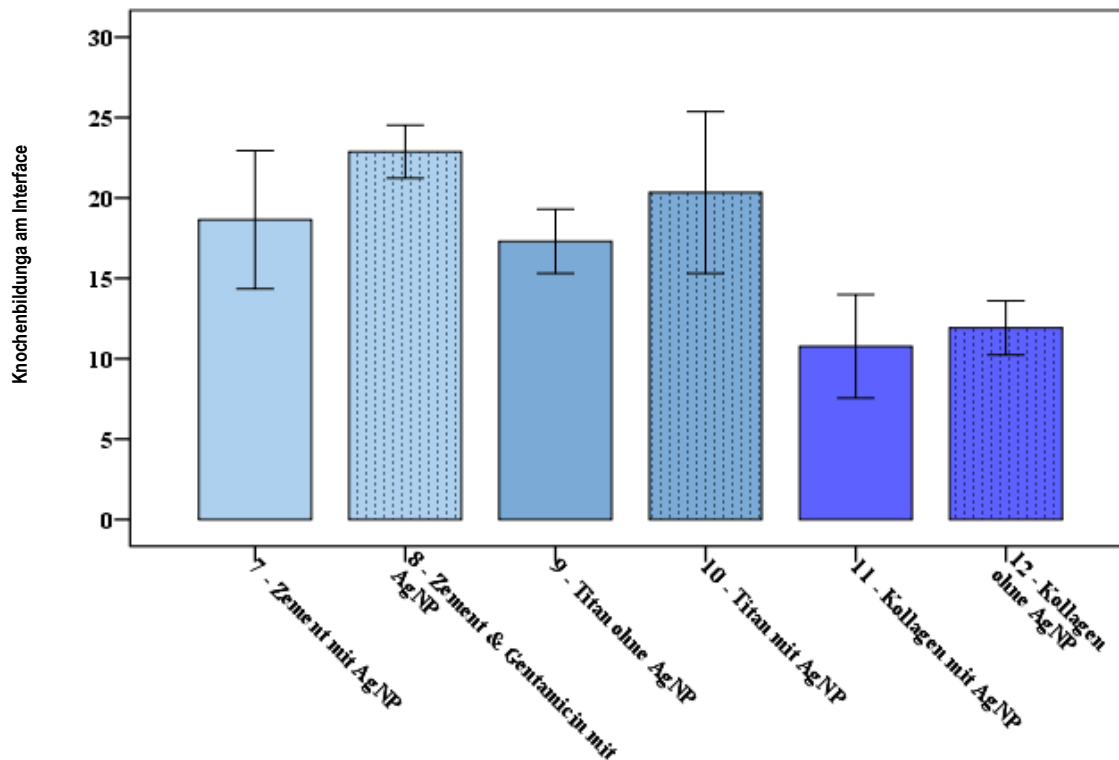


Abbildung 17: Durchschnittliche Knochenneubildung am Interface bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

Dargestellt sind die Mittelwerte als Säulen mit den Standardabweichungen (SEM).

3.2 Enzymhistochemische Analyse

3.2.1 TRAP-Histomorphometrie bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen oder 6 Monaten

Abbildung 18 zeigt die Verteilung TRAP-positiver, mehrkerniger (≥ 3) Zellen an der Oberfläche der Knochen trabekel [mm] im Bereich der ROI in den verschiedenen Versuchsgruppen nach einer vierwöchigen Standzeit der Implantate.

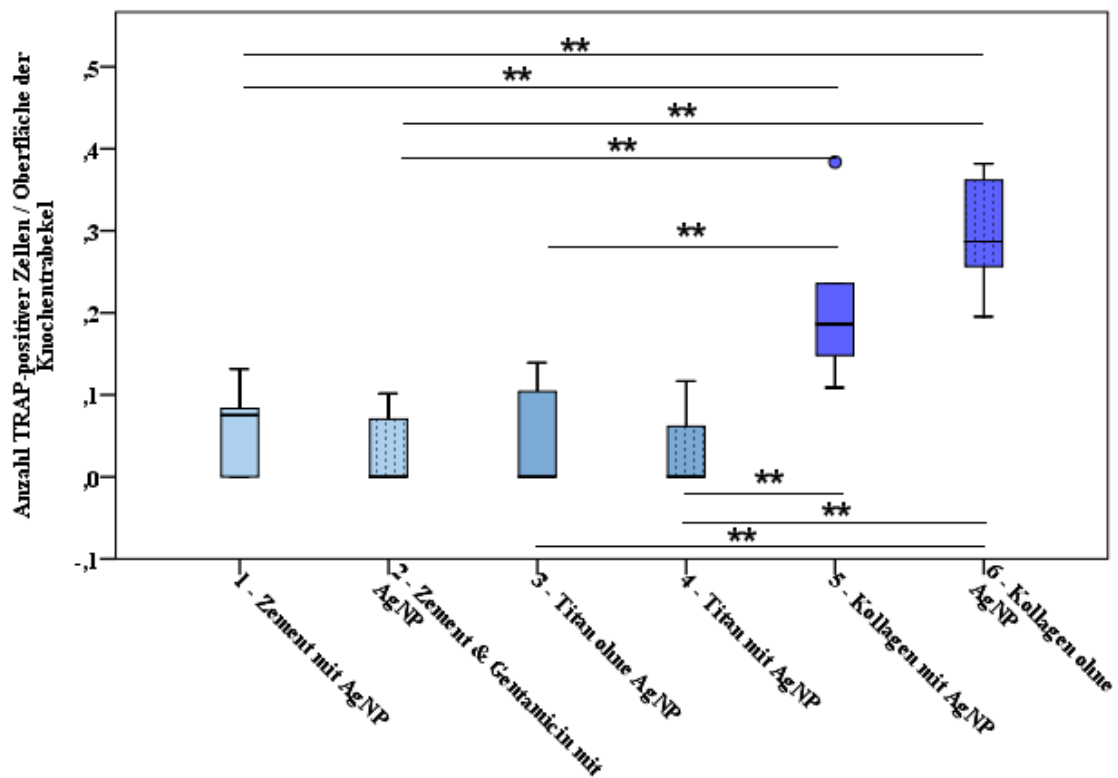


Abbildung 18: TRAP-Histomorphometrie bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

** hochsignifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$; ° Ausreißer
(Gruppe 5: 38,38 %)

Die Anzahl der untersuchten Fälle betrug $n=59$. Dem Kruskal-Wallis-Test zufolge bestand ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,01$). Beim paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-Test zeigten die Gruppen 1–4 hochsignifikante Unterschiede zu den Gruppen 5 und 6 (Tab. 7).

Tabelle 7: Statistischer Vergleich der TRAP-Werte der Gruppen 1–6 (Mann-Whitney-Test) bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

	Gruppe 5	Gruppe 6
Gruppe 1	$p=0,004^{**}$	$p=0,004^{**}$
Gruppe 2	$p=0,002^{**}$	$p=0,004^{**}$
Gruppe 3	$p=0,004^{**}$	$p=0,004^{**}$
Gruppe 4	$p=0,009^{**}$	$p=0,008^{**}$

Im Vergleich zu den anderen Implantaten zeigten die Kollagenimplantaten mit und ohne AgNP eine signifikant höhere Anzahl TRAP-positiver Zellen. Dementsprechend fielen die Mittelwerte der Gruppe 5 und der Gruppe 6 am höchsten aus (Tab. 8). Zwischen diesen beiden Gruppen lag mit $p=0,177$ kein signifikanter Unterschied vor. Die Nullhypothese wurde abgelehnt und den vorliegenden Werten lag keine Normalverteilung zugrunde. Ferner divergierten ebenso die beobachteten Werte vom ursprünglichen Lageparameter.

Abbildung 19 zeigt die Verteilung TRAP-positiver, mehrkerniger (≥ 3) Zellen an der Oberfläche der Knochentrabekel [mm] im Bereich der ROI in den verschiedenen Versuchsgruppen nach einer sechsmonatigen Standzeit der Implantate.

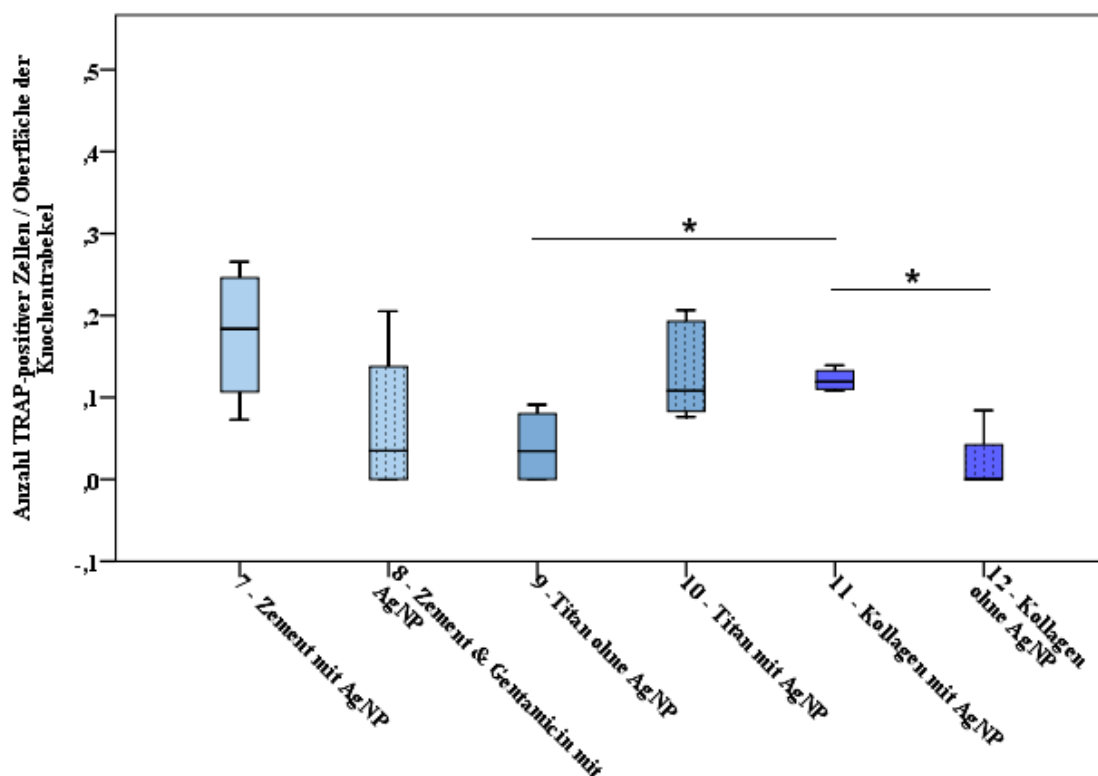


Abbildung 19: TRAP-Histomorphometrie bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

* signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$

Nach einer sechsmonatigen Standzeit der Implantate zeigten die Gruppen nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede bezüglich der TRAP-Zellzahl ($p=0,028$).

Diese Unterschiede bestätigten sich im Mann-Whitney-Test mit $p=0,029$ für Gruppe 9 und Gruppe 11 sowie mit $p=0,029$ für Gruppe 11 und Gruppe 12 (Abb. 19).

Abbildung 20 illustriert die Unterschiede der TRAP-positiven-Zellzahlen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten.

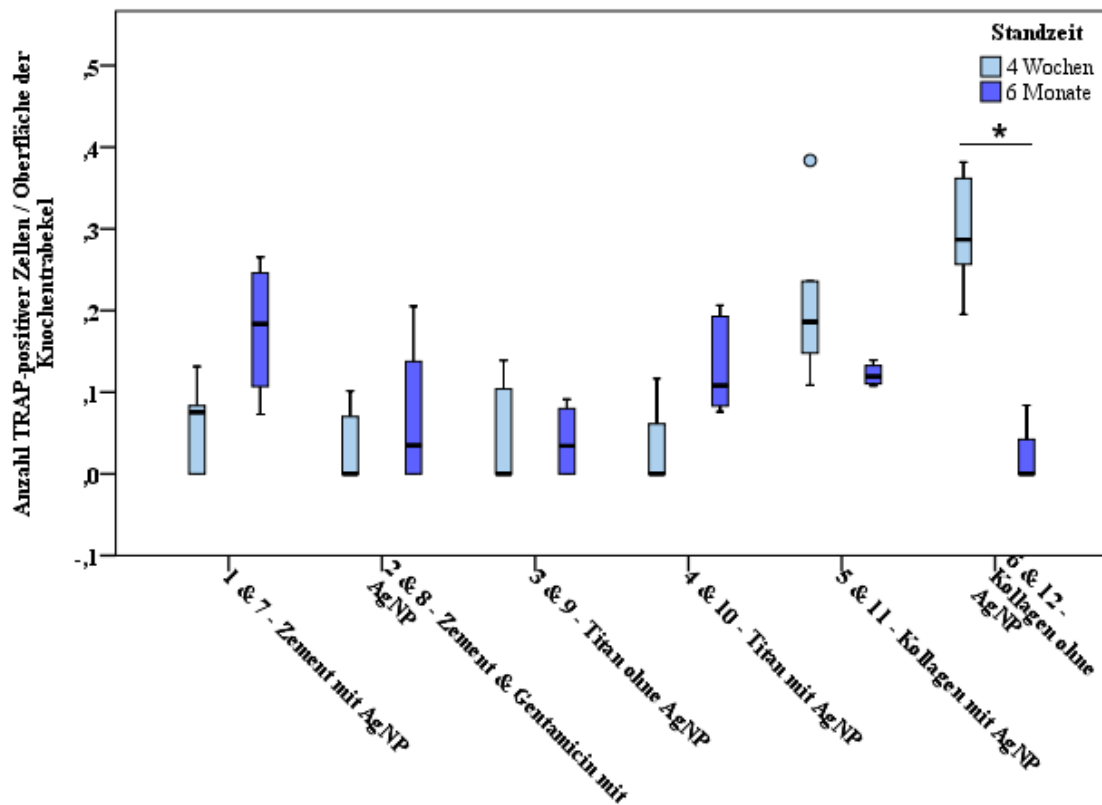


Abbildung 20: Vergleich der TRAP-Histomorphometrie für die Standzeiten 4 Wochen und 6 Monate

* signifikante Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$; ° Ausreißer (Gruppe 5: 38,38 %)

Nach dem Mann-Whitney-Test war lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 6 und Gruppe 12 zu verzeichnen ($p=0,016$), der einen deutlichen Rückgang der relativen Anzahl TRAP-positiver Zellen bei den Tieren mit Kollagenimplantaten ohne AgNP nach 6 Monaten von durchschnittlich 29,64% auf 2,1% kennzeichnete (Tab. 8).

Tabelle 8: Durchschnittliche Anteile TRAP-positiver Zellen in den verschiedenen Gruppen

Variable	Mittelwert [%]	Variable	Mittelwert [%]
Gruppe 1	6,09%, n=6	Gruppe 7	17,64%, n=4
Gruppe 2	2,86%, n=6	Gruppe 8	6,87%, n=4
Gruppe 3	4,05%, n=6	Gruppe 9	4 %, n=4
Gruppe 4	3,56%, n=5	Gruppe 10	13,33%, n=5
Gruppe 5	20,81%, n=6	Gruppe 11	12,14%, n=4
Gruppe 6	29,64%, n=5	Gruppe 12	2,1%, n=4

3.2.2 ALP-positive Oberflächen bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen oder 6 Monaten

Abbildung 21 zeigt den Anteil ALP-positiver Oberflächen [mm] im Verhältnis zur gesamten Oberfläche der Knochentrabekel [mm] im Bereich der ROI nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen.

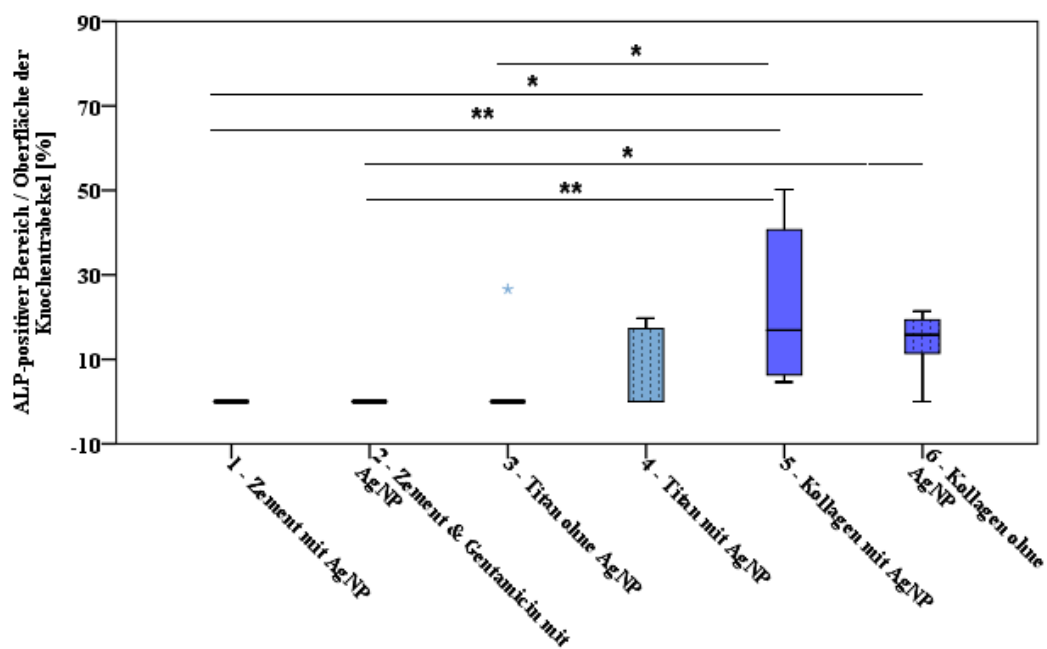


Abbildung 21: ALP-Histomorphometrie nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen

* signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$; ** hochsignifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$; ☆Extremwert (Gruppe 3: 26,6 %)

Die Summe der zu prüfenden Fälle ergab $n=61$. Nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test waren die Daten zwischen den Gruppen mit 4 Wochen Standzeit nicht normal verteilt ($p < 0,001$). Der Kruskal-Wallis-Test zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einer vierwöchigen Standzeit der Implantate ($p=0,002$), der bei einer Standzeit von 6 Monaten nicht mehr bestand ($p=0,453$; Abb. 22). Bei Anwendung des Mann-Whitney-Tests wurden hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit PMMA-Zementimplantaten (Gruppe 1 & 2) und der Gruppe mit Kollagenimplantaten mit AgNP detektiert (Tab. 9). Weiter bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit Zementimplantaten und der Gruppe mit Kollagenimplantate ohne AgNP und zwischen der Gruppe mit Titanimplantaten und Kollagenimplantaten jeweils ohne AgNP (Gruppe 3 und 5).

Tabelle 9: Signifikante Unterschiede bei den ALP-Werten der Gruppen mit vierwöchiger Standzeit der Implantate (Mann-Whitney-Test)

Variable	Gruppe 5	Gruppe 6
Gruppe 1	$p=0,002^{**}$	$p=0,03^{*}$
Gruppe 2	$p=0,002^{**}$	$p=0,03^{*}$
Gruppe 3	$p=0,026^{*}$	

Abbildung 22 zeigt den Anteil ALP-positiver Oberflächen [mm] im Verhältnis zur gesamten Oberfläche der Knochentrabekel [mm] im Bereich der ROI nach einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.

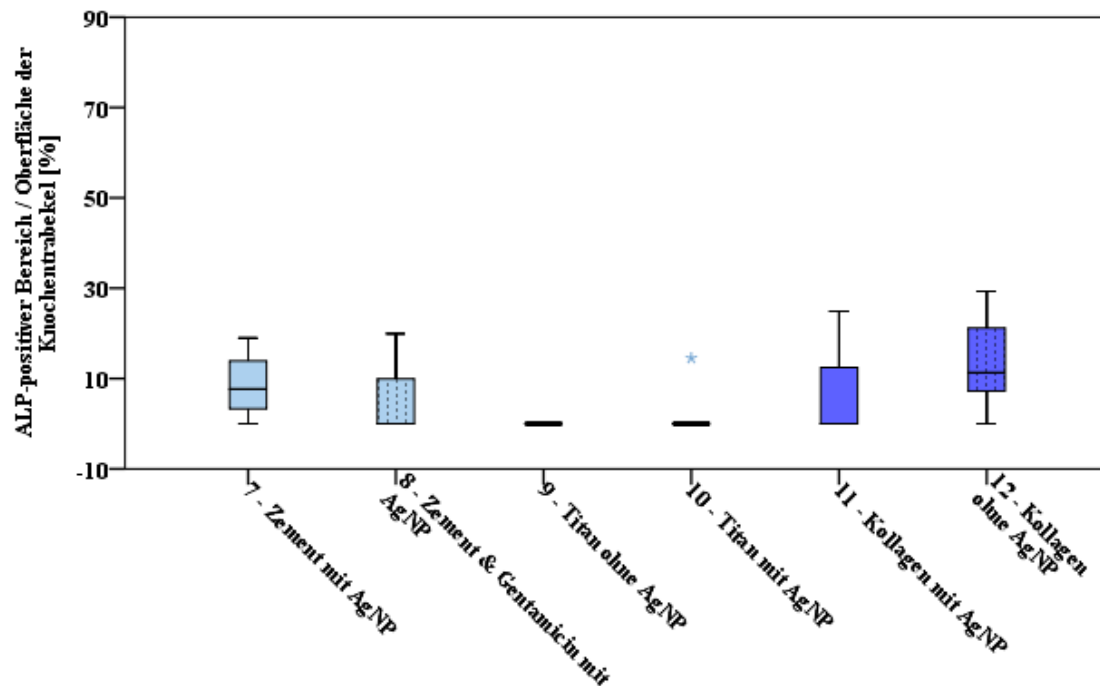


Abbildung 22: ALP-Histomorphometrie nach einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten

☆ Extremwert (Gruppe 10: 14,52 %)

Bei der Analyse des durchschnittlichen Anteils ALP-positiver Flächen (Tab. 10) fiel auf, dass in Gruppe 1 (PMMA-Zementimplantat mit AgNP) und Gruppe 2 (PMMA-Zementimplantat mit Gentamicin und AgNP) keine positiven ALP-Zellen auftraten. In Gruppe 3 (Titanimplantat ohne AgNP) war lediglich eine Ratte ALP-positiv, wodurch sich der Mittelwert auf 4,43% erhöhte (vgl. Abb. 22 und Tab. 10). Die Gruppe 4 (Titanimplantat mit AgNP) erreichte einen Mittelwert von 6,17%. In Gruppe 5 (Kollagenimplantat mit AgNP) wiesen alle Ratten (n=6) deutlich positive ALP-Reaktionen auf. Daraus resultierte in dieser Gruppe der im Vergleich höchste Mittelwert von 22,59%. Auch in der Gruppe mit dem Kollagenimplantat ohne AgNP (Gruppe 6) betrug der Anteil der ALP-positiven Bereiche 13,59%.

Tabelle 10: Durchschnittliche Größe der ALP-positiven Bereiche in den verschiedenen Gruppen

Variable	Mittelwert [%]	Variable	Mittelwert [%]
Gruppe 1	0%, n=6	Gruppe 7	8,59%, n=4
Gruppe 2	0%, n=6	Gruppe 8	4,98%, n=4
Gruppe 3	4,43%, n=6	Gruppe 9	73,6%, n=5
Gruppe 4	6,17%, n=6	Gruppe 10	2,9%, n=5
Gruppe 5	22,59%, n=6	Gruppe 11	8,29%, n=3
Gruppe 6	13,59%, n=5	Gruppe 12	13,81%, n=5

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Osseointegration von AgNP-dotierten Osteosynthesematerialien in einem experimentellen Tiermodell an der Ratte histomorphometrisch untersucht. Hierfür wurden den Ratten sechs verschiedene Implantate in die *Cavitas medullaris* der Tibiae eingesetzt. Nach Beobachtungszeiträumen von 4 Wochen sowie 6 Monaten wurden die Tiere euthanasiert. In den Querschnitten der Tibiae mit den Implantaten wurde der Anteil der Knochenfläche, die Knochenbildung und die Zahl der TRAP- bzw. ALP-positiven Zellen bestimmt. Bei den in der Diskussion aufgeführten Publikationen von Pauksch et al. handelt es sich um die *in vitro* Austestung der hier verwendeten Implantate (Pauksch et al. 2014a, Pauksch et al. 2014b, Pauksch et al. 2014c).

4.1 Verwendetes Tiermodell

Als Versuchstiere für die vorliegende Studie wurden Sprague-Dawley Ratten verwendet. Um interindividuelle Variationen soweit wie möglich auszuschließen wurden Ratten im gleichen Alter (16 Wochen) sowie weitgehend gleicher Größe und gleichem Gewicht (400 g) eingesetzt.

Die adulte Ratte ist für die Beurteilung des humanen spongiösen Knochens gut geeignet (Kimmel et Wronski 1990). Vorteilhaft für Untersuchungen sind auch ihre preiswerte Haltung und leichte Handhabung aufgrund ihrer Größe und ihrer zahmen Wesensart. Aufgrund ihrer Anatomie eignen sich Ratten gut für die Knochendefektforschung sowie für die Untersuchung von Implantaten (O'Loughlin et al. 2008, Meyers et al. 2017).

Die Frakturheilung und die biologischen Prozesse im Knochen werden durch das Alter beeinflusst. Die langsamere Frakturheilungstendenz bei älteren Ratten beruhen laut Studien auf einer reduzierten Expression von Genen, die für die mitochondriale Energieversorgung zuständig sind (Meyer et Meyer 2007, O'Loughlin et al. 2008, Histing et al. 2011).

Da weibliche Ratten zyklusabhängige Fluktuationen im Östrogenspiegel aufweisen und Östrogenderivate die Differenzierung und Proliferation mesenchymaler Stammzellen (Hong et al. 2009) und damit den Knochenstoffwechsel beeinflussen, wurden für die Versuche männliche Ratten verwendet.

Erste präklinische Studien werden in der Regel an kleineren Tieren wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen durchgeführt. Danach folgen Studien an Großtieren. Erst bei positiven Testergebnissen in den Tierstudien werden klinische Studien erwogen (O'Loughlin et al. 2008).

Die verwendeten Implantatzylinder wurden bei den Versuchstieren über das Tibiaplateau in die *Cavitas medullaris* eingesetzt. Die hohe Komplikationsrate, die mit externen Fixateuren und der Plattenosteosynthese verbunden ist, hat dazu geführt, dass die Behandlung von Tibiaschaftfrakturen bevorzugt über eine intramedulläre Nagelung erfolgt (Hamza et al. 1971, Edwards et al. 1988, Sanders et al. 1994, Trabulsy et al. 1994, Histing et al. 2011). Als negativ werden die teilweise hohen Infektionsraten im Zusammenhang mit der gebohrten intramedullären Nagelung beurteilt (Court-Brown et al. 1991, Keating et al. 1997). In der vorliegenden Studie wurde der Tibiamarkkanal mit einem Bohrer angebohrt, um die Implantate effektiv und schonend in die *Cavitas medullaris* einsetzen zu können. Laut einer Studie liegt die Infektionsrate bei einer Grad I und Grad II offenen Tibiafraktur bei 24% und die Bohrung ist für die Behandlung von offenen Tibiafrakturen kontraindiziert (Wiss et Stetson 1995). Die hohen Infektionsraten bei einer Bohrung sind am ehesten auf die Unterbrechung der endostealen Vaskularisation des Knochens zurückzuführen. In den meisten Fällen wird durch die Bohrung die *Arteria nutricia tibiae* geschädigt, die ohne Bohrung geschont wird (Brinker et al. 1999, Kakar et Tornetta 2007).

Vorteilhaft bei einer Implantation des Marknagels ohne Bohrung der Tibia ist auch, dass die kortikale Vaskularisation nicht weiter mechanisch bzw. laminär eingeschränkt wird (Schemitsch et al. 1994, Schemitsch et al. 1995). Des Weiteren kann die Bohrung eine thermale Nekrose des Markkanals induzieren, die im schlimmsten Fall mit einer Osteomyelitis einhergeht (Leunig et Hertel 1996, Kakar et al. 2007).

Verschiedene Studien nutzen Implantate, die in den Tibiamarkkanal der Ratte eingesetzt werden (Monzon et al. 2001, Yonekura et al. 2011). Ein Vorteil dieses Modells ist, dass über den gewählten Zugang die *Articulatio femorotibialis* und *Articulatio femoropatellaris* keinen Schaden nehmen, da keine Arthrotomie erforderlich ist. Die

Länge der Implantatzylinder (2 cm) liefert ausreichend Material für unterschiedliche Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Bereich in der proximalen Metaphyse der Tibia ausgewählt, der nicht mit dem Knochenmark der *Cavitas medullaris* in Berührung kam.

Der Durchmesser der *Cavitas medullaris* steigt im proximalen und distalen Segment. Durch die sanduhrförmige Gestalt entsteht – bei korrekter Anpassung – ein enger Kontakt zwischen dem Implantat und dem medullären Kanal der Tibia. Zur Metaphyse hin wird die tibiale Kortikalis dünner und ist zentral von der metaphysialen Spongiosa belegt (Kuhn et al. 2008). Die histologische Struktur der metaphysialen Spongiosa erlaubt eine bessere quantitative Messung der Trabekelflächen. Der Bereich unterliegt einer dynamischen Modellierung, bei der sich die Bälkchen gemäß den Trajektorien formieren.

Die Proben wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten histomorphometrisch untersucht. Nach einer vierwöchigen Standzeit der Implantate wird bei einer ausreichenden Biokompatibilität eine Knochenneubildung erwartet. Die Knochenheilungsrate und -geschwindigkeit variiert je nach Tiermodell (Bostrom et al. 1995, Nakamura et al. 1998, Chakkalakal et al. 1999, Shirley et al. 2005). Bei der Ratte dauert die durchschnittliche Frakturheilung etwa 4–5 Wochen. Dabei dominiert eine externe periostale Kallusbildung mit geringer medullärer Kallusbeteiligung (Wray et Lynch 1959). In der Klinik verbleiben Implantate jedoch zum Teil für mehrere Monate im Knochen, da die vollständige Knochenformation etwa 4–6 Monate dauert (Clarke 2008). Ferner belegen Studien, dass bei einer längerfristigen Exposition bzw. einem längeren Verbleib der AgNP-dotierten Implantate zytotoxische Effekte auftreten können (Flower et al. 2012, Patlolla et al. 2015). Aus diesem Grund wurden die Analysen in der vorliegenden Untersuchung nach einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten wiederholt. Alle verwendeten Materialien, inklusive der entwickelten Implantate, wurden im Vorfeld ausführlich *in vitro* getestet (Pauksch et al. 2014a, Pauksch et al. 2014b, Pauksch et al. 2014c).

4.2 Auswahl der Knochenersatzmaterialien

Für das vorliegende Projekt wurden verschiedene Osteosynthesematerialien, die zur Infektionsprophylaxe mit AgNP dotiert wurden, auf ihre Biokompatibilität hinsichtlich einer knöchernen Integration untersucht. In der Orthopädie und Unfallchirurgie werden für Knochendefekte und Endoprothesen verschiedene Implantate verwendet, deren Erfolg aber häufig aufgrund einer Keimbesiedlung der Implantatoberflächen limitiert ist. Daher kommt der Entwicklung von neuen Materialien mit antimikrobiellen Eigenschaften eine besondere Bedeutung zu.

Knochenzemente werden häufig bei endoprothetischen OPs für die Stabilisierung künstlicher Gelenke eingesetzt und füllen den Raum zwischen Knochen und Oberfläche der Prothese aus (Anagnostakos et Meyer 2017, Sharma et al. 2017). Weiter werden Knochenzemente in der Wirbelsäulenchirurgie bei traumatischen Verletzungen der *Corpus vertebrae* sowie bei osteoporotischen Veränderungen zur Spondylodese eingesetzt (Hoppe et Keel 2017, Spiegl et al. 2017). Knochenzemente wie PMMA liegen üblicherweise als Zwei-Komponenten-Systeme (Flüssigkeit/Pulver) vor. Die beim Mischen entstehende homogene Paste wird nach dem Einfüllen in den Knochen fest (Kuhn et Hontzsch 2015a). Für die vorliegende Studie wurden die Zementimplantate in fester Form eingesetzt, um konstante Implantatqualitäten zu gewährleisten. Die PMMA-Zementimplantate wurden mit 4000 µg AgNP/g Zement dotiert. Die Kontrollgruppe enthielt neben dem AgNP auch Gentamicinsulfat (1,34 %) zur Infektionsprophylaxe. Die doppelt dotierten Implantate zeigten eine AgNP-Freisetzungsrate von etwa 2,7 ng/g/mm² pro Tag nach fünf Tagen sowie 3,5 ng/g/mm² pro Tag nach 30 Tagen (Pauksch et al. 2014a).

Bereits Anfang der 1970er Jahre wurde dem PMMA-Zement Antibiotika zugesetzt (Buchholz et Engelbrecht 1970). Auf eine Kontrollgruppe ohne AgNP wurde in der vorliegenden Studie aufgrund der evidenten Biokompatibilität der Gentamicin-dotierten PMMA-Zemente verzichtet (Lucke et al. 2003). Eine Studie belegt die *in vitro* Effektivität von AgNP-dotierten PMMA-Zementen gegenüber multiresistenten Bakterienstämme (z.B. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und *epidermidis*) (Alt et al. 2004c). Weitere *in vitro* Tests ergaben, dass Knochenzement mit Gentamicinzusatz sowie Zement ohne Zusätze das Wachstum dieser beiden Bakterienstämme aufgrund ihrer Gentamicinresistenz nicht hemmen können (Alt et al. 2004b).

Im medizinischen Bereich wird Titan aufgrund seiner Korrosionsresistenz und Biokompatibilität häufig in Zahnimplantaten verwendet. In der Orthopädie und Unfallchirurgie wird es darüber hinaus für die Frakturversorgung sowie bei Gelenk-Endoprothesen eingesetzt. Die Titanimplantate bestehen aus Rohtitan (TiAl6V4-ELI), das zuvor mittels Vibrationszylinder poliert und per Ultraschalltechnik in Aceton und anschließend in Ethanol gereinigt wurde. Zur Verhinderung einer Keimbeseidlung wurde die Titanoberfläche durch plasmaelektrolytische Oxidation mit AgNP beschichtet. Für die Oberflächenfunktionalisierung mittels einer AgPURE W50 wurde eine Nano-Ag-Elektrolytdispersion (ras materials GmbH) mit 5 % AgNP verwendet. Nach Säuberung der Titanscheiben mit deionisiertem Wasser und einer Behandlung mit Ethanol betrug die Freisetzungsrage der AgNP-Beschichtung laut Atomabsorptionsspektrometrie $1,6 \text{ ng/g/mm}^2$ pro Tag (Gasqueres et al. 2012, Pauksch et al. 2014a). Um in der vorliegenden Untersuchung eine vergleichbare Oberfläche zu generieren, wurden die Titanimplantate der Kontrollgruppe ohne AgNP ebenfalls mit dem plasmaelektrolytischen Verfahren bearbeitet. Der erste Schritt einer bakteriellen Beseidlung ist das Anheften der Bakterien an die Oberfläche des Implantats. Die beschriebene Beschichtungstechnik mit AgNP für Titanimplantate verleiht der Oberfläche antiadhäsive Eigenschaften, die die Adhäsion von Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* verhindern (Juan et al. 2010, Liao et al. 2010, Geng et al. 2017).

Die Kollagenvlieseimplantate waren resorbierbare Kollagenzylinder aus Kollagen Typ I, deren Trägermaterial mit $4000 \text{ } \mu\text{g AgNP/g Kollagen}$ dotiert wurde. Die resorbierbaren Kollagenzylinder zeichnen sich durch die Förderung des Knochenwachstums aus (Sun et al. 2012, Kellesarian et al. 2018) und setzen im Vergleich zu Zement- und Titanimplantaten vermehrt AgNP frei. Trotz der hohen Biokompatibilität, stellt die Schaffung einer justierten Nanostruktur und die Absonderung nicht-kollagenöser Anteile wie Glykosaminoglykane und Enzyme eine große Herausforderung für die Herstellung von Kollagenimplantaten dar (Chen et al. 2009, Saeidi et al. 2012). Die Entfernung der nicht-kollagenösen Elemente aus dem Gewebe steigert die Biokompatibilität des Biomaterials, minimiert die Abstoßungsreaktion und fördert die Integration des Gerüsts im periprothetischen Bereich (Pieper et al. 1999, Allman et al. 2001, Chen et al. 2009, Oryan et al. 2013).

Die vielseitige Verwendung von Kollagen Typ I als Biomaterial beruht darauf, dass es eine große Oberfläche und hohe Porosität aufweist und ein gut miteinander verbundenes Porennetzwerk darstellt (Sun et al. 2008). Studien belegen, dass mit Kollagen I beschichtete Metallimplantate die Osseointegration fördern (Rammelt et al. 2004, Morra et al. 2006, Zhang et al. 2014, Kellesarian et al. 2018).

Obwohl sich bereits einige kommerziell erhältlichen Kollagen-basierte Implantatmaterialien (Apligraf®, Dermagraft®, Integra®) bei der Regeneration bewährt haben, ist ihr Einsatz aufgrund von potentiell auftretenden Ischämien und/oder Infektionen kritisch zu bewerten (Holmes et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kollagenzylinder mit und ohne AgNP-Dotierung verwendet. Sollte sich das dotierte Kollagenmaterial für die Infektionsprophylaxe als geeignet erweisen, könnte das Verfahren auch für die Herstellung von gewebspezifischem Material für die Versorgung von Hautverletzungen wie Verbrennungen oder Ulzerationen (Malik et al. 2013, Mulcahy et al. 2014) bzw. als Endokard-Implantaten in der Kardiologie bzw. Herzchirurgie genutzt werden (Athan et al. 2012, Alarcon et al. 2015, Van Dijck et al. 2015).

4.3 Parameter zum Nachweis der Biokompatibilität der Implantate

In der vorliegenden Arbeit wurden zur quantitativen Erfassung der Knochenfläche bzw. der Knochenneubildung zwei Messmethoden angewandt. Die bestimmte Knochenfläche umfasst die Knochen trabekelfläche in einem bestimmten Gesamtquerschnitt der Spongiosa bis an die angrenzende Kortikalis. Der Anteil der Knochenneubildung quantifiziert die Knochen trabekelfläche direkt um die Implantatstelle herum. Durch dieses Vorgehen konnte einerseits die gesamte Knochenbildung in dem Querschnitt und andererseits die Knochenbildung am Interface mit unmittelbarem Kontakt zu dem Fremdmaterial quantifiziert werden. Die Messungen erfolgten nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen und 6 Monaten. Die Messung der Ausgangswerte der Knochen trabekelflächen zum Zeitpunkt der OP war praktisch nicht umsetzbar. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss daher berücksichtigt werden, dass nicht garantiert werden kann, dass alle Versuchstiere über denselben Knochen trabekelanteil verfügen.

Die histomorphometrische Methode dient der Quantifizierung von Knochengewebsflächen bzw. -volumina und liefert Informationen über Knochenremodellierungsprozesse (Zellaktivität, Osteoid-Formation, Resorption) und Mineralisation (Tamminen et al. 2011). Als Goldstandard ist die Knochenhistomorphometrie eine etablierte Methode zur Analyse der Wirkung von Therapiealternativen am Knochen. Bei der Datenerhebung der Knochenparameter können aber Ungenauigkeiten auftreten (Parisien et al. 1988). Beispielsweise wurden in der vorliegenden Studie die Spongiosafläche und die Flächenzusammensetzungen der Proben visuell und damit subjektiv bestimmt. Bei vereinzelt Proben waren die Kortikalis und Spongiosagewebe nicht durchweg eindeutig voneinander abgrenzbar. Weiter sollte berücksichtigt werden, dass von jeder Probe nur ein Querschnitt der metaphysialen Spongiosa für die Datenerhebung berücksichtigt wurde, der nicht zwingend für den Knochenanteil bzw. die Knochenneubildung um das gesamte Implantat repräsentativ ist. Durch die manuelle Markierung aller Trabekelflächen mit dem Cursor wurden alle relevanten Flächen in die Berechnung inkludiert, wodurch eine zuverlässige Datenerhebung möglich war. Ein weiterer Nachteil ist die Invasivität des Vorgehens, da die histologischen Proben erst nach einer Euthanasie der Tiere und anschließender zeitaufwändiger Aufbereitung der Gewebeproben analysiert werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung ist die mikro-Computertomografie (μ -CT), die eine dreidimensionale Analyse der trabekulären Mikroarchitektur samt räumlicher Ausmessung der Knochenschichten ermöglicht (Tamminen et al. 2011, Xu et al. 2018). Die Genauigkeit der μ -CT-Quantifizierung hängt von der Bildauflösung ab. Für die Quantifizierung trabekulärer Strukturen wird eine relativ hohe Auflösung von 10–20 μ m Pixel benötigt (Muller 2003, Isaksson et al. 2011). Ferner werden μ -CT-Untersuchungen zur Beurteilung struktureller Knochenveränderungen (Uchiyama et al. 1997, Chen et al. 2017) und von antiresorptiven Medikamenten wie Bisphosphonate (Borah et al. 2004, Recker et al. 2005) und Teriparatide (Dempster et al. 2001, Jiang et al. 2003) genutzt. Diese Methode erlaubt zwar eine schnelle und genaue Quantifizierung von mineralisiertem Gewebe (Muller et al. 1998), jedoch lässt sich das Knochengewebe nicht hinsichtlich seines Reifungsgrades unterscheiden (Kochi et al. 2010). Für die exakte Differenzierung zwischen Kortikalis und Spongiosa sowie für die Detektion von Implantatloch/Granulationsgewebe und möglichen Artefakten ist die Histomorphometrie wesentlich zuverlässiger. Auch die Detektion von TRAP-positiven Zellen

bzw. ALP-positiven Bereichen ist mittels μ -CT nicht durchführbar (Tamminen et al. 2011, He et al. 2017).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Enzymhistochemie verknüpft den biochemischen Nachweis von Enzymaktivitäten mit der Bestimmung ihrer topographischen Lokalisation. Die Enzymhistochemie detektiert Enzymaktivitäten in Zellen bzw. Gewebekompartimente primär ohne exakte Quantifizierung (Meier-Ruge et Bruder 2008). Durch die manuelle Auszählung der TRAP-positiven, mehrkernigen Zellen am Knochentrabekel konnte in der vorliegenden Studie die Zahl der Osteoklasten als Maß für die Knochendegradation in Relation zur Gesamtoberfläche der Knochentrabekel gesetzt werden. Für die Quantifizierung der osteoinduktiven Wirkung der untersuchten Implantate wurden ALP-positive Oberflächen in Relation zur Gesamtoberfläche der Knochentrabekel gesetzt. Damit konnte durch die Messung der Enzymaktivitäten die knochenaufbauenden bzw. knochenabbauenden Prozesse quantifiziert und in den Gruppen mit den verschiedenen Implantaten verglichen werden. Knochentrabekel bestehen aus Knochengewebe in Form von schwammartigen Bälkchen, die trotz ihrer kompakten Struktur sich je nach Belastung bzw. Dynamik neu modellieren. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Versuchstiere gleichen Belastungen ausgesetzt waren, zumal die postoperative Haltung in Makrolonkäfige stattfand und somit von einer gewissen Einschränkung der Bewegung ausgegangen werden muss.

4.4 Einfluss der Implantate auf die Osseointegration

Nach 4 Wochen und 6 Monaten Standzeit der Implantate konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,514$ und $p=0,125$) hinsichtlich des Anteils der Knochenfläche festgestellt werden. Im paarweisen Vergleich (Mann-Whitney-Test) wurde deutlich, dass bei den untersuchten drei Materialien keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Dotierung auftraten. Die Gruppe mit dem PMMA-Zementimplantaten mit Gentamicin und AgNP zeigte zu beiden Messzeitpunkten einen relativ konstanten Knochenflächenanteil ($17,99 \pm 0,72\%$), wohingegen in den anderen Gruppen eine geringe Abnahme des Anteils der Knochenfläche nach 6 Monaten auftrat. Eine *in vitro* Untersuchung belegt überein-

stimmend mit den vorliegenden Ergebnissen, dass PMMA-Zementimplantate mit AgNP und Kontrollimplantate eine ähnliche Zytokompatibilität besitzen und dass die AgNP-Dotierung sich nicht negativ auf die osteogene Differenzierung auswirkt (Pauksch et al. 2014c, Moreira et al. 2015). Nach 4 Wochen war keine ALP-Aktivität bei den PMMA-Zementimplantaten messbar. Erst nach 6 Monaten traten ansatzweise ALP-positive Bereiche auf der Oberfläche der Knochentrabekel auf (Gruppe 7: 8,59 %, Gruppe 8: 4,98 %). Parallel dazu stieg auch die Anzahl der TRAP-positiven Zellen bei den PMMA-Zementimplantaten zwischen 4 Wochen (Gruppe 1: 6,09 %, Gruppe 2: 2,86 %) und 6 Monaten an (Gruppe 7: 17,64 %, Gruppe 8: 6,87 %).

Bezüglich der Knochenneubildung traten nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Kruskal-Wallis-Test; $p=0,047$), die aber nach einer Standzeit von 6 Monaten nicht mehr detektiert werden konnten ($p=0,069$). Der paarweise Vergleich der Gruppen mit den gleichen Implantatmaterialien (Mann-Whitney-Test) ergab keine signifikanten Differenzen durch die unterschiedlichen Dotierungen. Auch hier fiel der konstante Mittelwert in der Gruppe mit PMMA-Zementimplantaten mit Gentamicin und AgNP im zeitlichen Verlauf auf (nach 6 Monaten $22,87 \pm 1,66\%$). Eine experimentelle Studie mit Sprague-Dawley Ratten belegt, dass mit Gentamicin imprägnierter Zement möglicherweise eine Bakterienkolonisierung mit Gentamicin-resistenten Keimen fördert (Thomes et al. 2002). Die Autoren nutzten subkutane Implantate aus Knochenzement (Palacos®) mit Gentamicin und inokulierten die Wunde mit einer verdünnten *Staphylococcus epidermidis* Lösung (10^3 / ml). Diese Befunde deuten eine eingeschränkte Wirksamkeit einer Gentamicin-Dotierung zur Prophylaxe einer Bakterienbesiedlung von Implantaten an.

Zur Quantifizierung der Osteoklasten wurden in der vorliegenden Studie unmittelbar am Knochentrabekel befindliche TRAP-positive Zellen mit $3 \geq$ Zellkernen ausgezählt. Nach einer Standzeit von 4 Wochen traten signifikante Unterschiede bei der Anzahl der TRAP-positiven Zellen (Kruskal-Wallis-Test) auf. Der paarweise Vergleich (Mann-Whitney-Test) ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit Kollagen-Implantaten und den Gruppen mit anderen Implantatmaterialien. Nach 6 Monaten war ein deutlicher Rückgang der TRAP-positiven Zellen in der Gruppe 12 (Kollagenimplantate ohne AgNP) zu verzeichnen. Zu diesem Zeitpunkt bestand ein

signifikanter Unterschied bei den Gruppen mit Kollagenimplantaten mit und ohne AgNP ($p=0,029$). Derzeit gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss von AgNP auf die Osteoklastogenese beschreiben. Die relativ geringe Anzahl TRAP-positiver Zellen an der Oberfläche der Knochentrabekel bei den PMMA-Zementimplantaten stimmt jedoch mit den Ergebnissen einer *in vitro* Analyse überein, die zeigt, dass die Dotierung von PMMA-Zement mit Gentamicin und AgNP in Form eines synergistischen Effekts die Fusion von Präosteoklasten inhibiert (Pauksch et al. 2014a). Die Autoren vermuteten, dass Gentamicin die Oberfläche des Implantats vergrößert, wodurch es zu einer vermehrten AgNP-Exposition und nachfolgend zu einer stärkeren Zytotoxizität kommt (Pauksch et al. 2014a). Die Daten der vorliegenden Studie unterstützen diese Vermutung. Zu beiden Zeitpunkten war die Anzahl der TRAP-positiven Zellen in den PMMA-Zementimplantat-Gruppen mit Gentamicin + AgNP (Gruppe 2: 2,86 %, Gruppe 8: 6,87 %) geringer als in denen mit AgNP alleine (Gruppe 1: 6,09 %, Gruppe 7: 17,64 %).

Zur Quantifizierung der Osteoblasten wurde der Anteil der ALP-positiven Oberflächen an der Gesamtoberfläche der Knochentrabekel bestimmt. Auch hier zeigten die Gruppen mit Kollagenimplantaten zu beiden Messzeitpunkten (zum Teil) signifikant höhere Werte als die anderen Gruppen. Der geringe Rückgang der Knochenfläche und der Knochenneubildung spiegelt aber eine tendenzielle Knochendegradation in den Kollagenimplantat-Gruppen wider. Trotz der guten Biokompatibilität scheint das verwendete Kollagenmaterialien in Bezug auf die Osseointegration im Vergleich zu den anderen Implantaten nur bedingt geeignet. Das enge Netzwerk der Kollagenfasern mit kleinen Porengrößen schränkt möglicherweise den Sauerstofftransport ein. Die folgende Hypoxie verringert die Lebensfähigkeit der Zellen (Zhang et al. 2015). Die vorliegende Studie quantifiziert lediglich die Anzahl TRAP-positiver Zellen bzw. den Anteil ALP-positiver Bereiche. Für eine differenziertere Betrachtung müsste auch die spezifische Aktivität der positiven Zellen und deren Expressionsmuster analysiert werden. Möglicherweise könnte dadurch der Einfluss der Enzyme auf die Knochenfläche, bzw. Knochenneubildung evaluiert werden.

In einer weiteren histomorphometrischen Studie zur Quantifizierung der Knochenformation an der Rattentibia unter dem Einfluss verschiedener Titanimplantate wurden im Vergleich zu der vorliegenden Studie gleich lange (2 cm) aber dünnere

(Durchmesser 1 mm) verwendet (Yonekura et al. 2011). Die Beschichtung mit Ag₂O erfolgte mit der Thermal-Bespritzungstechnologie. Die 10 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten erhielten Titanimplantate ohne Beschichtung, HA-beschichtete Titanimplantate, 3% Ag-HA-Titanimplantate oder 50% Ag-HA-Titanimplantate. Die Knochenneubildung bzw. -kontaktbildung wurde nach 2, 4 und 12 Wochen untersucht. Auffällig waren die signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren mit 50% Ag-HA-Titanimplantaten und den anderen Gruppen. Möglicherweise inhibierte der hohe Gehalt an Ag die Knochenneubildung und führte zu einer erhöhten Zytotoxizität. Die 3% Ag-HA-Titanimplantate zeigten dagegen eine gute Osteokonduktivität. Die Ergebnisse mit dem 3% Ag-HA-Titanimplantaten sind mit den vorliegenden Ergebnissen mit 4000 µg AgNP/g Titanimplantate vergleichbar. Bei der Ag-HA-Beschichtung könnten aber verschiedene Faktoren (Schichtdicke, Auswaschen von Ag) die Wirkung von Ag reduziert haben (Noda et al. 2009, Yonekura et al. 2011). Interessant wäre an dieser Stelle gewesen, beim vorliegenden Projekt Titanimplantate mit unterschiedlichem AgNP-Gehalt an AgNP zu analysieren, um die optimale AgNP-Dotierung zu bestimmen.

Laut einer *in vitro* Untersuchung begünstigt AgNP in geringen Konzentration die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen, die Zytokinausschüttung sowie die Chemotaxis, wohingegen höhere Konzentrationen (>10 µM) die Funktionalität der Stammzellen beeinträchtigen (Zhang et al. 2015). Die genauen Ursachen für die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen durch AgNP sind bislang nicht geklärt. Eine Rolle spielt aber möglicherweise dabei, dass sphärische mit Polyvinylpyrrolidone-beschichtete AgNP in die DNA von mesenchymalen Stammzellen interkalieren, eine vermehrte Expression von IL-8 bewirken und über den Hypoxie-induzierten Faktor-1α die Zell-Proliferation verstärken (Jung et al. 2014). Weiterhin führte die Transplantation eines Kollagen Typ I Gels mit eingekapselten AgNP (0,2 und 0,4 mM) in eine murine Femurfraktur zu einer gesteigerten Osteogenese (Zhang et al. 2015). Mesenchymale Stammzellen leisten einen wesentlichen Beitrag zur Kallusformation (Einhorn 2005). In der Femurfrakturstudie wurde der Heilungsprozess mittels Radiografie beurteilt. Am 7. postoperativen Tag zeigten beide Gruppen (± AgNP) einen Frakturspalt mit ansetzender Kallusformation. Am 14. Tag war nur noch in der Kontrollgruppe ein partieller Frakturspalt erkennbar. Nach 21 postoperativen Tagen wurde der Frakturspalt durch Kallusformation endgültig überbrückt. Zur Bestätigung der radiografischen Befunde wurden die Mäuse nach 21 Tagen histologisch analysiert (Zhang et al. 2015). In Bezug

auf die Knochenneubildung zeigten auch in dem vorliegenden Projekt die AgNP-dotierten Kollagenimplantate mit 19,54% nach 4 Wochen eine stärkere Knochenneubildung als die Kontrollgruppe ohne AgNP (14,6%). Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,132$). In den wenigen Studien mit AgNP-dotierten Kollagenmaterialien inklusive der vorliegenden Analyse (über die Messung der ALP-Aktivität) zeigen mesenchymale Stammzellen eine ausgeprägte Tendenz zur Differenzierung in Osteoblasten (Sun et al. 2008, Sun et al. 2015).

4.5 Einfluss von AgNP auf die Biofilmbildung

Cheng et al. (2014) beschäftigten sich mit den langfristigen antibakteriellen Eigenschaften von AgNP und deren Fähigkeit, Biofilmbildungen an Implantaten frühzeitig zu unterbinden. Sie verwendeten Nanotube-Titanimplantate (TiO_2 -NTs), die mit AgNP per elektrochemischer Anodisation dotiert wurden (Albu et al. 2007). Die entwickelten TiO_2 -NTs enthalten ein Ag-Reservoir, aus dem die AgNP über einen längeren Zeitraum abgegeben werden und folglich die Biofilmproduktion effektiv beeinträchtigen und dabei nur eine minimale Zytotoxizität entfalten. Zwei Wochen nach der OP wiesen die Rattentibiae mit Titanimplantaten und TiO_2 -NT Knochen-deformationen und Hinweise auf eine Osteomyelitis auf, wohingegen die Tiere mit TiO_2 -NT mit AgNP eine effektive Knochenbildung mit antibakterieller Wirkung zeigten (Cheng et al. 2014).

In vitro und *in vivo* Biokompatibilitätsanalysen von orthopädischen und unfallchirurgischen Implantaten mit AgNP-Beschichtungen kommen häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Effektivität von Osteosynthesematerialien (Ewald et al. 2006, Das et al. 2008). In einer Analyse zur Biofilmbildung wurde Kaninchen ein 2 mm breiter Kirschner-Draht aus Ag-beschichtetem Titan, Ag-beschichtetem Stahl sowie Kontrollmaterialien ohne Ag in das distale Ende des Femurs eingesetzt. Parallel dazu wurde der Femurkanal mit *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* inokuliert. In Bezug auf die bakterielle Adhäsion konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ag-beschichteten Implantaten und den Kontrollgruppen registriert werden (Sheehan et al. 2004). In einer aktuelleren *in vivo* Studie wurden die Implantate nicht mit metallischem Ag beschichtet, sondern ein

Keramik-Nanopulver aus Calciumphosphat mit aktiveren Ag-Ionen entwickelt. Damit wurden 2,5 mm große Titanimplantate dotiert (Kose et al. 2013). Die Implantation und Bakterieninokulation erfolgte nach der gleichen Methode wie bei Sheehan et al. (2004). Die antimikrobiellen Eigenschaften der Ag-dotierten Implantate waren günstiger als die der Kontrollimplantate, da weniger Osteomyelitiden auftraten (Kose et al. 2013, Wilding et al. 2016). Die beiden Studien belegen, dass durch die Ag-Beschichtung biologisch aktive Implantate konstruiert werden können (Brennan et al. 2015).

4.6 Freisetzung von Ag-Ionen aus AgNP – Biokompatibilität

Eine der grundsätzlichen Komplikationen bei der Entwicklung von AgNP-dotierten Osteosynthesematerialien ist die Kontrolle der Freisetzungsrates der Ag-Ionen. Eine unkontrollierte Ag-Ionen-Freisetzung kann an den engen, knöchernen Konnektionsstellen der Implantate das umliegende Gewebe zytotoxisch angreifen (Wang et al. 2013). Die Implantation von AgNP-Implantaten ist bei Patienten mit traumatischen oder iatrogenen Verletzungen des Knochens indiziert. Daher ist der Einfluss von AgNP auf den Knochenmetabolismus von besonderer Bedeutung. In einer Studie zur Wirkung von AgNP auf primäre humane mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten waren höhere AgNP-Dosen (10 µg/g) mit einer Zytotoxizität assoziiert, was bei der Findung der therapeutischen Dosis berücksichtigt werden muss (Pauksch et al. 2014b). AgNP wird von mesenchymalen Stammzellen aufgenommen und findet sich intrazellulär in endolysosomalen Strukturen, jedoch nicht im Zellkern (Greulich et al. 2011). In einer Studie zur *in vitro* Zytotoxizität und antibakteriellen Wirkung gegenüber Antibiotika-resistenten Keimen in humanen osteoblastischen Zelllinien zeigten lediglich höhere AgNP-Konzentrationen (3,0 g L⁻¹) eine ausgeprägte Zytotoxizität. Niedrigere Konzentrationen (0,3 g L⁻¹) erlaubten ein optimales Zellwachstum der Osteoblasten bei ausreichenden antibakteriellen Effekten (Necula et al. 2012). Folglich ist die Zytotoxizität sowohl auf die Konzentration als auch auf die Größe der AgNP zurückzuführen. Die Biokompatibilität ist eng mit den Auswirkungen auf die Osteoblasten und Osteoklasten verknüpft (Brennan et al. 2015).

Im Hinblick auf die Zytotoxizität ist interessant, dass AgNP-dotierte Implantate die DNA-Synthese bei Frauen im gebärfähigen Alter beeinträchtigen können. AgNP

hemmten die neurale Entwicklung in Phäochromozytom-(PC12)-Zellen, die als Modell für die Differenzierung und Neurosekretion dienten (Powers et al. 2011a). Anschließend untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die Auswirkung von AgNP auf embryonale Zebrafische. In diesem Modell wirkten AgNP neurotoxisch und lösten neurologische Verhaltensstörungen aus. Die Effekte hingen eng mit der AgNP-Partikelgröße bzw. Funktionalisierung zusammen (Powers et al. 2011b, Powers et al. 2011c, Brennan et al. 2015).

4.7 Knochenaufbau und -abbau

Die Osteogenese ist ein komplexer Prozess, der die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Präosteoblasten, Osteoblasten und reife Osteoblasten und die Synthese der Knochenmatrix und -mineralisation beinhaltet (Wozney et al. 1988, Santos et al. 2011). Daher ist die Verwendung von Biomaterialien mit osteoinduktiver Wirkung auf mesenchymale Stammzellen von großem wissenschaftlichen Interesse (Zhang et al. 2015). Die kubischen Osteoblasten befinden sich an der Oberfläche von Knochengewebe und machen etwa 4–6 % der gesamten Zellen im Knochen aus (Capulli et al. 2014). Als Knochenmatrix-produzierende Zellen sind sie reich an Organellen (raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat sekretorische Vesikel) (Marks et Popoff 1988, Capulli et al. 2014). Als polare Zellen sezernieren Osteoblasten das Osteoid in Richtung der Knochenmatrix (Damoulis et Hauschka 1997, Florencio-Silva et al. 2015).

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Stammzellen ab und benötigen für Differenzierung eine zeitlich abgestimmte Expression von bestimmten Genen (z.B. BMP, Proteine des *Wingless* (Wnt) Signalwegs (Grigoriadis et al. 1988). Des Weiteren ist die Expression von *Runx-related transcriptionfactor 2* (Runx2), *distal-less homeobox* (Dlx5) und *osterix* (Osx) für die Osteoblastendifferenzierung erforderlich (Ducy et al. 1997, Capulli et al. 2014). Runx2 fungiert als Mastergen und aktiviert Osteoblastenspezifische Gene wie *collagen type I alpha 1* (Col1A1), ALP, *bone sialoprotein* (BSP) und Osteocalcin (OCN) (Ducy et al. 1997, Komori et al. 1997, Fakhry et al. 2013, Florencio-Silva et al. 2015).

Runx2 und Col1A1 exprimierende Osteoblastenvorläufer leiten die Proliferationsphase ein, in der ALP-exprimierende Präosteoblasten entstehen (Capulli et al. 2014). Der Übergang von Präosteoblasten in reife Osteoblasten ist durch die Expression von Osx sowie durch die Produktion von Knochenmatrixproteinen (z.B. OCN, BSP I/II, Kollagen Typ I) gekennzeichnet (Ducy et al. 1997). Außerdem nehmen Osteoblasten an Größe zu und bilden eine einzelne Schicht von Kuboidzellen (Nakashima et al. 2002, Glass et al. 2005, Hu et al. 2005, Florencio-Silva et al. 2015).

Einige der Osteoblasten lagern sich in die Knochenmatrix ein und transformieren zu Osteozyten (Manolagas 2000, Jilka et al. 1998) oder sterben durch Apoptose.

Osteoklasten sind terminal differenzierte mehrkernige Zellen, die von mononukleären Zellen der hämatopoetischen Stammzelllinie abstammen. Osteoklasten unterliegen dem Einfluss verschiedener Faktoren. Dazu gehört der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), der von mesenchymalen Vorläuferzellen und Osteoblasten sezerniert wird, und der *Receptor activator of nuclear factor-kappa B Ligand* (RANKL), der von Osteoblasten, Osteozyten und Stromazellen gebildet wird (Crockett et al. 2011). Gemeinsam fördern diese Faktoren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Yavropoulou et Yovos 2008) und Expression osteoklastenspezifischer Gene (Takayanagi 2007, Florencio-Silva et al. 2015).

M-CSF bindet an einen Rezeptor (cFMS) auf Osteoklastenvorläuferzellen und stimuliert deren Proliferation und inhibiert gleichzeitig die Apoptose (Yoshida et al. 1990, Yavropoulou et al. 2008). Als Gegenspieler fungiert Osteoprotegerin (OPG), das von Osteoblasten, Stromazellen und gingivalen Fibroblasten produziert wird (Boyce et Xing 2008, Longhini et al. 2013, Longhini et al. 2014). OPG bindet an RANKL und verhindert die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor (*Receptor activator of nuclear factor-kappa B*, RANK) und somit die Entstehung der Osteoklasten (Boyce et al. 2008). Folglich ist die Konstellation aus RANK/RANKL/OPG ein bedeutender Mediator der Osteoklastogenese (Sodek et McKee 2000, Phan et al. 2004, Longhini et al. 2014).

Die Bindung von RANKL an RANK führt zur Expression von Osteoklastenspezifischen Faktoren wie *nuclear factor of activated T-cells 1* (NFATc1) und *dendritic cell specific transmembrane protein* (DC-STAMP). NFATc1 interagiert mit Transkriptionsfaktoren wie dem Purin-reich 1 (PU.1), cFos und dem Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor (MITF), um die Expression von Osteoklastenspezifischen Genen wie TRAP und Kathepsin K zu regulieren (Matsumoto et al. 2004).

Bei einer Verbindung von RANKL/RANK induziert NFATc1 die Expression von DC-STAMP, das für die Fusion von Osteoklasten-Vorläufern essentiell ist (Miyamoto 2006).

Das Potenzial der beschriebenen Einflussfaktoren variiert je nach Knochen. Osteoklasten werden im Knochenmark der langen Röhrenknochen schneller gebildet als im Kiefer. Diese unterschiedlich ausgeprägte Dynamik der Osteoklastogenese ist am ehesten auf die zelluläre Komposition des Knochenmarks zurückzuführen (Faloni et al. 2011).

Während der Remodellierung polarisieren die Osteoklasten. Dabei kann die Zellmembran in vier Bereiche unterteilt werden: Die Versiegelungszone (*sealing zone*) und der Faltensaum (*ruffled border*) stehen in Kontakt zur Knochenmatrix. Dieser Kontakt fehlt der basolateralen und funktional sekretorischen Domäne (Mulari et al. 2003, Arana-Chavez et Bradaschia-Correa 2009, Florencio-Silva et al. 2015).

Der Faltensaum ist von besonderer Bedeutung für die Osteoklasten-Aktivität. Durch die Endozytoseaktivität in diesem Bereich werden die aufgelösten Matrixkomponenten in die Lysosomen-reichen Zellen transportiert. Im Faltensaum befindet sich die H⁺-ATPase vom Vakuolen-Typ (V-ATPase), die über eine Ansäuerung HA-Kristalle auflöst (Kornak et al. 2001, Graves et al. 2008, Crockett et al. 2011). In dieser Region werden Protonen und Enzyme wie TRAP, Cathepsin K und Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) in die Howship-Lakune befördert, um dort die Knochendegradation durchzuführen (Yamaza et al. 1998, Mulari et al. 2003, Ljusberg et al. 2005, Graves et al. 2008, Faloni et al. 2012). Die Produkte dieser Degradation werden im Faltensaum über Endozytose aufgenommen und durch Transzytose an der sekretorischen Domäne der Plasmamembran freigesetzt (Teitelbaum 2007, Arana-Chavez et al. 2009).

Der dynamische Zustand des Knochens resultiert somit aus klar definierten, koordinierten Aktionen von knochenabbauenden Osteoklasten, knochenbildenden Osteoblasten, Osteozyten innerhalb der Knochenmatrix und von Saumzellen (*bone lining cells*) an der Knochenoberfläche (Sims et Gooi 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die knöcherne Integration der Implantate innerhalb eines definierten Abschnitts der Tibia untersucht. Da die Knochenformation im Wesentlichen von Osteoblasten und Osteoklasten abhängt, wurden die Anzahl dieser Zellen im Umfeld des Implantats enzymhistochemisch (Osteoblasten über die ALP-Aktivität, Osteoklasten über TRAP-Aktivität) quantifiziert. Für eine gelungene knöcherne Integration sind nicht nur viele

Osteoblasten wünschenswert, vielmehr ist ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten erforderlich. Der Grund hierfür ist, dass knöcherne Gewebe als *basic multicellular units* (BMU) aufgefasst werden, in denen zeitgleich Knochen durch Osteoklasten abgebaut und Knochen durch Osteoblasten aufgebaut werden (Sims et al. 2008). Der koordinierte Ablauf dieses Knochenremodellings ist für Aufrechterhaltung der natürlichen anatomischen Strukturen der BMU notwendig (Hauge et al. 2001, Andersen et al. 2009, Florencio-Silva et al. 2015).

Das Knochenremodelling ist für Prozesse wie Frakturheilung und Anpassung an biomechanische Belastungen von großer Bedeutung. Ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung führt unweigerlich zu einer Erkrankung. Beispielsweise bewirkt eine massive Resorption durch Osteoklasten ohne entsprechende Knochenneubildung bei der Osteoporose den Verlust von Knochensubstanz (Khosla et al. 2012). Umgekehrt hat eine massive Knochenneubildung eine Osteopetrose zur Folge (Charles et Aliprantis 2014, Florencio-Silva et al. 2015).

Das Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und -resorption hängt von lokalen und systemischen Faktoren wie Hormonen, Zytokinen, Chemokinen und der biomechanischen Stimulation ab. Aus diesem Grund könnten individuelle Stoffwechsel-lagen sowie der Hormonhaushalt der Versuchstiere die Daten der vorliegenden Studie verzerrt haben (Phan et al. 2004, Crockett et al. 2011, Florencio-Silva et al. 2015).

Die ausgeglichene Aktivität zwischen Osteoblasten und Osteoklasten ist auf die Zeitspanne der Adoleszenz beschränkt (Lips et al. 1978) und in der Wachstumsphase zu Gunsten der Osteoblasten verschoben. Daher wurde für die vorliegende Untersuchung das Alter der Ratte auf 16 Wochen festgelegt.

4.8 Beschichtung von Implantaten

Bei der Herstellung von geeigneten Knochenersatzmaterialien ist die Modifizierung der Implantatoberflächen von besonderer Bedeutung. Im Idealfall besitzen die Oberflächen antiadhäsive Eigenschaften, sind mit antimikrobiellen Substanzen dotiert, wirken der Biofilmbildung entgegen und fördern die Knochenbildung (Alt 2017).

Heparin verhindert aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften die Adhäsion der Bakterien und ist daher ein adäquates Mittel für eine antiadhäsive Beschichtung

(Arciola et al. 1995). Die molekulare Basis der antiadhäsiven Wirkung von Heparin basiert auf der Inhibition der Interaktion zwischen Fibronectin und Bakterien. Die bakterielle Adhäsion auf periprothetischen Oberflächen kann auch durch hydrophile Polymerbürsten aus Polyethylenglycol oder Polyethylenoxid inhibiert werden (Arciola et al. 2012, Neoh et Kang 2011).

Die Integration von Antibiotika in Implantatoberflächen geht mit dem Risiko einer Resistenzentwicklung einher. Auch das natürliche kationische Polysaccharid Chitosan hat sich als effektive antimikrobielle Beschichtung für Implantate erwiesen (Neoh et al. 2011). Hinsichtlich des Mechanismus wird davon ausgegangen, dass Chitosan positiv geladene Moleküle besitzt und die Bakterien hingegen eine negativ geladene Zellmembran, die demgemäß mit einem Verlust der intrazellulären Komponente behaftet ist (Arciola et al. 2012).

Neuere Studien belegen, dass quaternisierte Chitosan-Derivate, die Biofilmproduktion, insbesondere von Antibiotika-resistenten Staphylokokken, inhibieren und die Genexpression von für die Methicillin-Resistenz verantwortlichen Proteinen (z.B. *inhibitor of caspase activated DNase* (icaAD), *methicillin-resistant gene* (mecA)) hemmen (Arciola et al. 2012, Tan et al. 2012). Ähnlich inhibitorische Effekte auf Biofilme besitzt das hydrophobe Polykation N, N-Hexyl, Methyl-Polyethylenimin, das *in vitro* keine Zytotoxizität zeigt (Behlau et al. 2011).

Eine mehrschichtige Dotierung mit Heparin und Chitosan kombiniert antiadhäsive und antimikrobielle Eigenschaften (Fu et al. 2005).

Aufgrund des zunehmenden Auftretens bakterieller Resistenzen und dem Bedarf an neuen Antibiotikaklassen haben sich in den vergangenen Jahren die natürlichen antimikrobiellen Peptide (AMP) als eine interessante Therapiealternative für periprothetische Infektionen bewährt (Kang et al. 2012), obwohl einige gramnegative Bakterien gegenüber der AMP-vermittelten Immunabwehr resistent sind (Gruenheid et Le Moual 2012). AMP treten bei Säugetieren in phagozytischen Zellen, auf Körperoberflächen (Haut, Mukosa) und in verschiedenen Körperflüssigkeiten auf und wirken auf ein breites Spektrum an pathogenen Mikroorganismen (Gruenheid et al. 2012). Daher gibt es Forschungsbestrebungen, die auf eine synthetische Herstellung von AMP abzielen (Gruenheid et al. 2012).

HA-Beschichtungen sind durch eine langsame *in vivo* Degradation charakterisiert und fördern die Osseointegration (Campoccia et al. 2003). Weiterhin zeichnen sich mit N, N-Docedyl, Methyl-Polyethylenimin beschichtete Implantate durch eine verminderte

Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* und eine gute Knochenheilungstendenz *in vivo* aus (Schaer et al. 2012).

Neuere Materialien wie 58S Bioglas, das mit antibakteriellen (0,1 % bzw. 1 %) Goldnanopartikel dotiert wurde, zeigt eine gute Integration in den Knochen und gute antibakterielle Eigenschaften gegen *Staphylococcus aureus*, nicht aber gegen *Escherichia coli* (Grandi et al. 2011). Des Weiteren weisen auch Kupfer, Zink, Magnesium und insbesondere Ag- und Goldnanopartikel antibakterielle Aktivitäten auf (Kurek et al. 2011).

Per Sol-Gel-Prozesse synthetisierte Titanoxid-(TiO₂)-Nanopartikel, die mit Stickstoff und Silberoxid (Ag₂O/TiO₂N) dotiert wurden, erwiesen sich als effektive Fotokatalysatoren (Wu et al. 2010). Die bakterizide Wirkung gegen *Escherichia coli* wurde über eine Irradiation ($\lambda > 400$ nm) unter sichtbarem Licht erzielt (Wu et al. 2010). Der Wirkmechanismus beruht auf einer oxidativen Schädigung der Zellwand und der Zellkonfiguration.

4.9 Fazit der Untersuchung

Zusammenfassend zeigten die mit AgNP dotierten Knochenersatzmaterialien eine gute *in vivo* Verträglichkeit. Bei keinem der Implantate mit AgNP konnte ein signifikanter Verlust der Knochentrabekelbildung im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. Vielmehr zeigte die Gruppe mit PMMA-Zementimplantaten mit Gentamicin und AgNP mit den anderen Gruppen vergleichbar hohe Anteile an Knochenflächen und Knochenneubildung am Interface zu beiden untersuchten Standzeiten. Die Kollagenimplantate zeichneten sich zwar durch eine erhöhte Bioaktivität bei den TRAP- und ALP-Messungen aus, jedoch war nach 6 Monaten Standzeit der Implantate eine tendenzielle Knochendegradation festzustellen. Insgesamt hat sich AgNP für die Osseointegration bei den untersuchten Implantaten nicht als hinderlich erwiesen. Die Biokompatibilität von AgNP sollte aber mit weiteren Messmethoden getestet werden. Ferner müssen in Zukunft die antibakterielle Wirkung von AgNP geprüft sowie potentielle Gesundheitsrisiken im Zusammenhang mit AgNP berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Die in der Orthopädie und Unfallchirurgie häufig vorkommenden periprothetischen Infektionen haben weitreichende medizinische und sozioökonomische Konsequenzen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Biokompatibilität von antimikrobiell wirkenden Silbernanopartikeln (AgNP) über die Analyse der Osseointegration intramedullärer Implantate in der Tibia von Sprague-Dawley Ratten untersucht werden. Eingesetzt wurden Polymethylmethacrylat-(PMMA)-Zementimplantate (+ AgNP / + AgNP + Gentamicin), Titan (TiAl6V4-ELI \pm AgNP) und Kollagen-Typ-1-Implantate (\pm AgNP). Die Tibiaquerschnitte wurden nach einer Standzeit von 4 Wochen und 6 Monaten histomorphometrisch analysiert. Als Parameter der Osseointegration dienten die Knochenflächenanteile (Trabekelfläche eines definierten Gesamtquerschnitts der Spongiosa), die Knochenneubildung, die Anteile Tartrat-resistente saure Phosphatase-(TRAP)-positiver Zellen (Osteoklastenaktivität) und die alkalische Phosphatase-(ALP)-positiven Interface-Anteile zwischen Implantat und Knochen (Osteoblastenaktivität).

Alle Versuchstiere überstanden die postoperative Kontrollprozedur ohne Auffälligkeiten. Zu den beiden Messzeitpunkten (4 Wochen / 6 Monate) traten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anteils der Knochenflächen und der Knochenneubildung zwischen den Gruppen auf. Bemerkenswert war der konstante Anteil der Knochenfläche und der Knochenneubildung (Vergleich 4 Wochen / 6 Monate) in der PMMA-Zement-Gruppe mit Gentamicin und AgNP. Die Titanimplantate (\pm AgNP) zeigten zu beiden Zeitpunkten eine höhere Knochenneubildung am Interface als an der gesamten Knochenfläche. Die Kollagenimplantate (\pm AgNP) waren in den TRAP- und ALP-Analysen zu beiden Zeitpunkten durch eine signifikant höhere Bioaktivität als die anderen Gruppen charakterisiert. Diese erhöhte Bioaktivität spiegelte sich aber nicht in einer erhöhten Knochenfläche/-neubildung wider. In keinem Fall führte eine AgNP-Dotierung zu einer signifikanten Abnahme der erhobenen Biokompatibilitätsparameter im Vergleich zu den Kontrollen. Zusammenfassend belegen die *in vivo* Experimente, dass eine AgNP-Dotierung die Osseointegration nicht negativ beeinflusst.

6 Summary

Commonly occurring periprosthetic infections in orthopedics and trauma surgery are accompanied by serious medical and socioeconomic problems. The present study explores the biocompatibility of antimicrobial silvernanoparticle (AgNP) by analyzing the osseointegration of intramedullary implants within tibiae of sprague-dawley rats. Implants consisting of poly-methylmethacrylate (PMMA) bone cement (+ AgNP / + AgNP + Gentamicin), titanium (TiAl6V4-ELI \pm AgNP) and collagen type 1 (\pm AgNP) were inserted. The tibiae cross sections were analyzed histomorphometrically after 4 weeks and 6 months observational periods. As parameters of osseointegration, the amount of bone area (trabecular surface area of a defined cross section), the formation of new bone, the relative number of osteoclasts (tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells) and the amount of alkaline phosphatase (ALP) positive osteoblasts at the interface of implant and bone were analyzed.

All experimental animals have withstood postoperative control procedure without abnormality. At both measurement times (4 weeks / 6 months) there were no significant differences concerning the amount of bone area and bone neoformation between the groups. Remarkably, the amount of bone area and the bone neoformation keep constant (4 weeks / 6 months) in the PMMA bone cement group with gentamicin and AgNP. Titanium implants (\pm AgNP) showed for both investigation time points a higher amount of bone formation at the interface, than at the whole bone area. The collagen implants (\pm AgNP) were characterized by significantly higher bioactivity concerning TRAP and ALP analysis for both investigation time points than the other groups. The high bioactivity did not reflect a higher amount of bone area/-neoformation. AgNP-doting did not lead to reduced biocompatibility compared controls. Summarizing, the in vivo experiments verified that a AgNP-doting did not affect the osseointegration adversely.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
AgNP	Silbernanoartikel
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Antimikrobielle Peptide
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>basic multicellular unit</i>
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
ColIA1	<i>collagen type I alpha 1</i>
DC-STAMP	<i>dendritic cell specific transmembrane protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HA	Hydroxyapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
μ-CT	mikro-Computertomografie
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
Osx	<i>Osterix</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappa B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappa B Ligand</i>
ROI	<i>region of interest</i>
Runx2	<i>Runt-related transcriptionfactor 2</i>
SEM	Standardfehler
TiO ₂	Titanoxid

TiO ₂ -NTs	Nanotube-Titanimplantat
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Verursacher von Implantat-assoziierten Infektionen; modifiziert nach (Campoccia et al. 2006)	3
Abbildung 2: Schemazeichnung der Tibia und Fibula einer Ratte samt Implantat in der Cavitas medullaris der Tibia	16
Abbildung 3: Titanimplantat (A) und Kollagenimplantat (B).....	16
Abbildung 4: Applikation des Temperatur-Transponders (A) und Ablesung der Körpertemperatur (B).....	19
Abbildung 5: Operationssitus an der linken Tibia	19
Abbildung 6: Implantation des Knochenersatzmaterials	20
Abbildung 7: Euthanasie	22
Abbildung 8: Anfertigung der Tibia-Schnitte	23
Abbildung 9: HE-Aufnahme eines Querschnitts durch die Tibia mit dem Implantat zur Berechnung des Knochenflächenanteils.....	28
Abbildung 10: HE-Aufnahme eines Querschnitts durch die Tibia mit dem Implantat zur Berechnung der Knochenneubildung	29
Abbildung 11: TRAP-Aufnahme einer ROI um die Implantatstelle – Nachweis der Osteoklasten	30
Abbildung 12: ALP Aufnahme einer ROI um die Implantatstelle – Nachweis der ALP- positiven Trabekeloberflächen	31
Abbildung 13: Anteil der Knochenfläche der Tibia bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen.....	33
Abbildung 14: Anteil der Knochenfläche der Tibia bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.....	35
Abbildung 15: Anteil der Knochenbildung am Interface bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen	37
Abbildung 16: Anteil der Knochenbildung am Interface bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.....	38
Abbildung 17: Durchschnittliche Knochenneubildung am Interface bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten	40

Abbildung 18: TRAP-Histomorphometrie bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen.....	41
Abbildung 19: TRAP-Histomorphometrie bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.....	42
Abbildung 20: Vergleich der TRAP-Histomorphometrie für die Standzeiten 4 Wochen und 6 Monate.....	43
Abbildung 21: ALP-Histomorphometrie nach einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen.....	44
Abbildung 22: ALP-Histomorphometrie nach einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.....	46

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen; pro Gruppe: n=6	18
Tabelle 2: Paraffineinbettung (h: Stunden, min: Minuten, RT: Raumtemperatur)	24
Tabelle 3: Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen	34
Tabelle 4: Anteil der Knochenfläche bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten	36
Tabelle 5: Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen.....	37
Tabelle 6: Anteil der Knochenneubildung bei einer Standzeit der Implantate von 6 Monaten.....	39
Tabelle 7: Statistischer Vergleich der TRAP-Werte der Gruppen 1–6 (Mann-Whitney- Test) bei einer Standzeit der Implantate von 4 Wochen	41
Tabelle 8: Durchschnittliche Anteile TRAP-positiver Zellen in den verschiedenen Gruppen	44
Tabelle 9: Signifikante Unterschiede bei den ALP-Werten der Gruppen mit vierwöchiger Standzeit der Implantate (Mann-Whitney-Test)	45
Tabelle 10: Durchschnittliche Größe der ALP-positiven Bereiche in den verschiedenen Gruppen	47

10 Literaturverzeichnis

Abou Neel, E. A., L. Bozec, J. C. Knowles, O. Syed, V. Mudera, R. Day, and J. K. Hyun (2013). Collagen-emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev* 65(4): 429-456.

Alarcon, E. I., K. I. Udekwu, C. W. Noel, L. B. Gagnon, P. K. Taylor, B. Vulesevic, M. J. Simpson, S. Gkotzis, M. M. Islam, C. J. Lee, A. Richter-Dahlfors, T. F. Mah, E. J. Suuronen, J. C. Scaiano, and M. Griffith (2015). Safety and efficacy of composite collagen-silver nanoparticle hydrogels as tissue engineering scaffolds. *Nanoscale* 7(44): 18789-18798.

Albu, S. P., A. Ghicov, J. M. Macak, R. Hahn, and P. Schmuki (2007). Self-organized, free-standing TiO₂ nanotube membrane for flow-through photocatalytic applications. *Nano Lett* 7(5): 1286-1289.

Allman, A. J., T. B. McPherson, S. F. Badylak, L. C. Merrill, B. Kallakury, C. Sheehan, R. H. Raeder, and D. W. Metzger (2001). Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation* 71(11): 1631-1640.

Alt, V. (2017). Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics-A clinical review and risk-benefit analysis. *Injury* 48(3): 599-607.

Alt, V., T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, and R. Schnettler (2004a). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25(18): 4383-4391.

Alt, V., T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, and R. Schnettler (2004b). In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(11): 4084-4088.

Alt, V., T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, D. Scheddin, E. Domann, and R. Schnettler (2004c). Nanoparticulate silver. A new antimicrobial substance for bone cement. *Orthopade* 33(8): 885-892.

Alt, V., A. Bitschnau, J. Osterling, A. Sewing, C. Meyer, R. Kraus, S. A. Meissner, S. Wenisch, E. Domann, and R. Schnettler (2006). The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 27(26): 4627-4634.

Anagnostakos, K. and C. Meyer (2017). Antibiotic Elution from Hip and Knee Acrylic Bone Cement Spacers: A Systematic Review. *Biomed Res Int* 2017: 4657874.

Andersen, T. L., T. E. Sondergaard, K. E. Skorzynska, F. Dagnaes-Hansen, T. L. Plesner, E. M. Hauge, T. Plesner, and J. M. Delaisse (2009). A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am. J. Pathol.* 174(1): 239-247.

Arana-Chavez, V. E. and V. Bradaschia-Correa (2009). Clastic cells: Mineralized tissue resorption in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(3): 446-450.

Arciola, C. R., D. Campoccia, S. Gamberini, M. E. Donati, L. Baldassarri, and L. Montanaro (2003). Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. *Acta Orthop Scand* 74(5): 617-621.

Arciola, C. R., D. Campoccia, and L. Montanaro (2002). Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2(5): 478-484.

Arciola, C. R., D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, and J. W. Costerton (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 33(26): 5967-5982.

Arciola, C. R., M. C. Maltarello, E. Cenni, and A. Pizzoferrato (1995). Disposable contact lenses and bacterial adhesion. In vitro comparison between ionic/high-water-content and non-ionic/low-water-content lenses. *Biomaterials* 16(9): 685-690.

Arciola, C. R., L. Montanaro, A. Moroni, M. Giordano, A. Pizzoferrato, and M. E. Donati (1999). Hydroxyapatite-coated orthopaedic screws as infection resistant materials: in vitro study. *Biomaterials* 20(4): 323-327.

Arciola, C. R., L. Radin, P. Alvergnà, E. Cenni, and A. Pizzoferrato (1993). Heparin surface treatment of poly(methylmethacrylate) alters adhesion of a *Staphylococcus aureus* strain: utility of bacterial fatty acid analysis. *Biomaterials* 14(15): 1161-1164.

Arora, M., E. K. Chan, S. Gupta, and A. D. Diwan (2013). Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature. *World J Orthop* 4(2): 67-74.

Athan, E., V. H. Chu, P. Tattevin, C. Selton-Suty, P. Jones, C. Naber, J. M. Miro, S. Ninot, N. Fernandez-Hidalgo, E. Durante-Mangoni, D. Spelman, B. Hoen, T. Lejko-Zupanc, E. Cecchi, F. Thuny, M. M. Hannan, P. Pappas, M. Henry, V. G. Fowler, Jr., A. L. Crowley, A. Wang, and I-P. Investigators (2012). Clinical characteristics and outcome of infective endocarditis involving implantable cardiac devices. *JAMA* 307(16): 1727-1735.

Aubin, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2(1): 81-94.

Balachandran, M., R. J. Giannone, D. A. Bemis, and S. A. Kania (2017). Molecular basis of surface anchored protein A deficiency in the *Staphylococcus aureus* strain Wood 46. *PLoS One* 12(8): e0183913.

Behlau, I., K. Mukherjee, A. Todani, A. S. Tisdale, F. Cade, L. Wang, E. M. Leonard, F. R. Zakka, M. S. Gilmore, F. A. Jakobiec, C. H. Dohlman, and A. M. Klibanov (2011). Biocompatibility and biofilm inhibition of N,N-hexyl,methyl-polyethylenimine bonded to Boston Keratoprosthesis materials. *Biomaterials* 32(34): 8783-8796.

Berberi, E. F., A. D. Hanssen, M. C. Duffy, J. M. Steckelberg, D. M. Ilstrup, W. S. Harmsen, and D. R. Osmon (1998). Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 27(5): 1247-1254.

Bleiziffer, I., J. Eikmeier, G. Pohlentz, K. McAulay, G. Xia, M. Hussain, A. Peschel, S. Foster, G. Peters, and C. Heilmann (2017). The Plasmin-sensitive Protein Pls in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a glycoprotein. *PLoS Pathog.* 13(1): e1006110.

Borah, B., T. E. Dufresne, P. A. Chmielewski, T. D. Johnson, A. Chines, and M. D. Manhart (2004). Risedronate preserves bone architecture in postmenopausal women

with osteoporosis as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Bone* 34(4): 736-746.

Bostrom, M. P., J. M. Lane, W. S. Berberian, A. A. Missri, E. Tomin, A. Weiland, S. B. Doty, D. Glaser, and V. M. Rosen (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J. Orthop. Res.* 13(3): 357-367.

Boyce, B. F. and L. Xing (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 473(2): 139-146.

Brennan, S. A., C. Ni Fhoghlu, B. M. Devitt, F. J. O'Mahony, D. Brabazon, and A. Walsh (2015). Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *Bone Joint J* 97-B(5): 582-589.

Brinker, M. R., S. D. Cook, J. N. Dunlap, P. Christakis, and M. N. Elliott (1999). Early changes in nutrient artery blood flow following tibial nailing with and without reaming: a preliminary study. *J. Orthop. Trauma* 13(2): 129-133.

Bruzzaniti, A. and R. Baron (2006). Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7(1-2): 123-139.

Buchholz, H. W. and H. Engelbrecht (1970). Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg* 41(11): 511-515.

Buck, D. W., 2nd and G. A. Dumanian (2012). Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast. Reconstr. Surg.* 129(6): 1314-1320.

Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker (1995). Bone biology part 1: structure, blood-supply, cells, matrix, and mineralization. *J. Bone Joint Surg. Am.* 77a(8): 1256-1275.

Bush, K. (2018). Game Changers: New beta-lactamase inhibitor combinations targeting antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *ACS Infect Dis* 4(2): 84-87.

Campoccia, D., C. R. Arciola, M. Cervellati, M. C. Maltarello, and L. Montanaro (2003). In vitro behaviour of bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on fluorohydroxyapatite-coated substrata with different roughness. *Biomaterials* 24(4): 587-596.

Campoccia, D., L. Montanaro, and C. R. Arciola (2006). The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27(11): 2331-2339.

Capulli, M., R. Paone, and N. Rucci (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* 561: 3-12.

Chakkalakal, D. A., B. S. Strates, A. A. Mashoof, K. L. Garvin, J. R. Novak, E. D. Fritz, T. J. Mollner, and M. H. McGuire (1999). Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone* 25(3): 321-332.

Chang, Y., C. L. Tai, P. H. Hsieh, and S. W. Ueng (2013). Gentamicin in bone cement: A potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. *Bone Joint Res* 2(10): 220-226.

Charles, J. F. and A. O. Aliprantis (2014). Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol. Med.* 20(8): 449-459.

Chen, J., L. Chen, C. C. Chang, Z. Zhang, W. Li, M. V. Swain, and Q. Li (2017). Micro-CT based modelling for characterising injection-moulded porous titanium implants. *Int J Numer Method Biomed Eng* 33(1).

Chen, J., J. Xu, A. Wang, and M. Zheng (2009). Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev. Med. Devices* 6(1): 61-73.

Cheng, H., Y. Li, K. Huo, B. Gao, and W. Xiong (2014). Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 102(10): 3488-3499.

Choi, O., K. K. Deng, N. J. Kim, L. Ross, Jr., R. Y. Surampalli, and Z. Hu (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res* 42(12): 3066-3074.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3 Suppl 3: S131-139.

Claro, T., A. Widaa, C. McDonnell, T. J. Foster, F. J. O'Brien, and S. W. Kerrigan (2013). Staphylococcus aureus protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiology* 159(Pt 1): 147-154.

Cordero, J., L. Munuera, and M. D. Folgueira (1996). Influence of bacterial strains on bone infection. *J. Orthop. Res.* 14(4): 663-667.

Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418): 1318-1322.

Court-Brown, C. M., M. M. McQueen, A. A. Quaba, and J. Christie (1991). Locked intramedullary nailing of open tibial fractures. *J. Bone Joint Surg. Br.* 73(6): 959-964.

Crockett, J. C., D. J. Mellis, D. I. Scott, and M. H. Helfrich (2011). New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos. Int.* 22(1): 1-20.

Damoulis, P. D. and P. V. Hauschka (1997). Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 12(3): 412-422.

Das, K., S. Bose, A. Bandyopadhyay, B. Karandikar, and B. L. Gibbins (2008). Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 87(2): 455-460.

Das, S., N. Ranjana, A. J. Misra, M. Suar, A. Mishra, A. J. Tamhankar, C. S. Lundborg, and S. K. Tripathy (2017). Disinfection of the water borne pathogens escherichia coli and staphylococcus aureus by solar photocatalysis using sonochemically synthesized reusable Ag@ZnO core-shell nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14(7).

Dempster, D. W., F. Cosman, E. S. Kurland, H. Zhou, J. Nieves, L. Woelfert, E. Shane, K. Plavetic, R. Muller, J. Bilezikian, and R. Lindsay (2001). Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J. Bone Miner. Res.* 16(10): 1846-1853.

- Ding, X., P. Yuan, N. Gao, H. Zhu, Y. Y. Yang, and Q. H. Xu (2017). Au-Ag core-shell nanoparticles for simultaneous bacterial imaging and synergistic antibacterial activity. *Nanomedicine* 13(1): 297-305.
- Dobrzynska, M. M., A. Gajowik, J. Radzikowska, A. Lankoff, M. Dusinska, and M. Kruszewski (2014). Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo. *Toxicology* 315: 86-91.
- Downey, P. A. and M. I. Siegel (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys. Ther.* 86(1): 77-91.
- Duan, K. and A. Kumar (2018). Understanding bacterial antibiotic resistance and pathogenicity through investigating bacterial membrane proteins. *J. Membr. Biol.* 251(1): 1-3.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty (1997). Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5): 747-754.
- Edwards, C. C., S. C. Simmons, B. D. Browner, and M. C. Weigel (1988). Severe open tibial fractures. Results treating 202 injuries with external fixation. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(230): 98-115.
- Einhorn, T. A. (2005). The science of fracture healing. *J. Orthop. Trauma* 19(10 Suppl): S4-6.
- El Attal, R., M. Hansen, R. Rosenberger, V. Smekal, P. M. Rommens, and M. Blauth (2011). Intramedullary nailing of the distal tibia illustrated with the Expert(TM) tibia nail. *Oper. Orthop. Traumatol.* 23(5): 397-410.
- Elek, S. D. (1956). Experimental staphylococcal infections in the skin of man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 65(3): 85-90.
- Engesaeter, L. B., S. A. Lie, B. Espehaug, O. Furnes, S. E. Vollset, and L. I. Havelin (2003). Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop. Scand.* 74(6): 644-651.

- Evans, R. C. and C. J. Holmes (1987). Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(6): 889-894.
- Ewald, A., S. K. Gluckermann, R. Thull, and U. Gbureck (2006). Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online* 5: 22.
- Fakhry, M., E. Hamade, B. Badran, R. Buchet, and D. Magne (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells* 5(4): 136-148.
- Faloni, A. P., E. Sasso-Cerri, F. R. Rocha, E. Katchburian, and P. S. Cerri (2012). Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *J. Anat.* 220(1): 77-85.
- Faloni, A. P. D., T. Schoenmaker, A. Azari, E. Katchburian, P. S. Cerri, T. J. de Vries, and V. Everts (2011). Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcif. Tissue Int.* 88(1): 63-74.
- Fang, C., T. M. Wong, T. W. Lau, K. K. To, S. S. Wong, and F. Leung (2017). Infection after fracture osteosynthesis - Part I. *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)* 25(1): 2309499017692712.
- Feng, Q. L., J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52(4): 662-668.
- Florencio-Silva, R., G. R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simoes, and P. S. Cerri (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* 2015: 421746.
- Flower, N. A., B. Brabu, M. Revathy, C. Gopalakrishnan, S. V. Raja, S. S. Murugan, and T. S. Kumaravel (2012). Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 742(1-2): 61-65.

Fu, J., J. Ji, W. Yuan, and J. Shen (2005). Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* 26(33): 6684-6692.

Galvez-Lopez, R., A. Pena-Monje, R. Antelo-Lorenzo, J. Guardia-Olmedo, J. Moliz, J. Hernandez-Quero, and J. Parra-Ruiz (2014). Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78(1): 70-74.

Gasqueres, C., G. Schneider, R. Nusko, G. Maier, E. Dingeldein, and A. Eliezer (2012). Innovative antibacterial coating by anodic spark deposition. *Surf Coat Tech* 206(15): 3410-3414.

Geng, H., G. Poologasundarampillai, N. Todd, A. Devlin-Mullin, K. L. Moore, Z. Golrokhi, J. B. Gilchrist, E. Jones, R. J. Potter, C. Sutcliffe, M. O'Brien, D. W. L. Hukins, S. Cartmell, C. A. Mitchell, and P. D. Lee (2017). Biotransformation of silver released from nanoparticle coated titanium implants revealed in regenerating bone. *ACS Appl Mater Interfaces* 9(25): 21169-21180.

Glass, D. A., 2nd, P. Bialek, J. D. Ahn, M. Starbuck, M. S. Patel, H. Clevers, M. M. Taketo, F. Long, A. P. McMahon, R. A. Lang, and G. Karsenty (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell* 8(5): 751-764.

Gonzalez, A. G., L. Fernandez-Rojo, J. Leflaive, O. S. Pokrovsky, and J. L. Rols (2016). Response of three biofilm-forming benthic microorganisms to Ag nanoparticles and Ag(+): the diatom *Nitzschia palea*, the green alga *Uronema confervicolum* and the cyanobacteria *Leptolyngbya* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23(21): 22136-22150.

Götz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43(6): 1367-1378.

Grandi, S., V. Cassinelli, M. Bini, E. Saino, P. Mustarelli, C. R. Arciola, M. Imbriani, and L. Visai (2011). Bone reconstruction: Au nanocomposite bioglasses with antibacterial properties. *Int. J. Artif. Organs* 34(9): 920-928.

- Graves, A. R., P. K. Curran, C. L. Smith, and J. A. Mindell (2008). The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature* 453(7196): 788-792.
- Greulich, C., J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, and M. Koller (2011). Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 7(1): 347-354.
- Greulich, C., S. Kittler, M. Epple, G. Muhr, and M. Koller (2009). Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch. Surg.* 394(3): 495-502.
- Grigoriadis, A. E., J. N. M. Heersche, and J. E. Aubin (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell-population - effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* 106(6): 2139-2151.
- Gristina, A. G. (1994). Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(298): 106-118.
- Gruenheid, S. and H. Le Moual (2012). Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 330(2): 81-89.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006). Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092: 385-396.
- Hamza, K. N., G. E. Dunkerley, and C. M. Murray (1971). Fractures of the tibia. A report on fifty patients treated by intramedullary nailing. *J. Bone Joint Surg. Br.* 53(4): 696-700.
- Hannah, A., T. Aboelmagd, G. Yip, and P. Hull (2014). A novel technique for accurate Poller (blocking) screw placement. *Injury* 45(6): 1011-1014.
- Hauge, E. M., D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde, and F. Melsen (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J. Bone Miner. Res.* 16(9): 1575-1582.

- He, T., C. Cao, Z. Xu, G. Li, H. Cao, X. Liu, C. Zhang, and Y. Dong (2017). A comparison of micro-CT and histomorphometry for evaluation of osseointegration of PEO-coated titanium implants in a rat model. *Sci. Rep.* 7(1): 16270.
- Hellmann, M., S. D. Mehta, D. M. Bishai, S. C. Mears, and J. M. Zenilman (2010). The estimated magnitude and direct hospital costs of prosthetic joint infections in the United States, 1997 to 2004. *J. Arthroplasty* 25(5): 766-771 e761.
- Histing, T., P. Garcia, J. H. Holstein, M. Klein, R. Matthys, R. Nuetzi, R. Steck, M. W. Laschke, T. Wehner, R. Bindl, S. Recknagel, E. K. Stuermer, B. Vollmar, B. Wildemann, J. Lienau, B. Willie, A. Peters, A. Ignatius, T. Pohlemann, L. Claes, and M. D. Menger (2011). Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49(4): 591-599.
- Hoiby, N., O. Ciofu, H. K. Johansen, Z. J. Song, C. Moser, P. O. Jensen, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, and T. Bjarnsholt (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3(2): 55-65.
- Holmes, C., J. S. Wrobel, M. P. Maceachern, and B. R. Boles (2013). Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 6: 17-29.
- Hong, L., H. Sultana, K. Paulius, and G. Zhang (2009). Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 114(3-5): 180-185.
- Hoppe, S. and M. J. Keel (2017). Pedicle screw augmentation in osteoporotic spine: indications, limitations and technical aspects. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* 43(1): 3-8.
- Hu, H., M. J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D. M. Ornitz, and F. Long (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132(1): 49-60.
- Hudson, M. C., W. K. Ramp, and K. P. Frankenburg (1999). Staphylococcus aureus adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiol. Lett.* 173(2): 279-284.

- Huotari, K., O. Lyytikäinen, J. Ollgren, M. J. Virtanen, S. Seitsalo, R. Palonen, P. Rantanen, and T. Hospital Infection Surveillance (2010). Disease burden of prosthetic joint infections after hip and knee joint replacement in Finland during 1999-2004: capture-recapture estimation. *J. Hosp. Infect.* 75(3): 205-208.
- Inzana, J. A., E. M. Schwarz, S. L. Kates, and H. A. Awad (2016). Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials* 81: 58-71.
- Isaksson, H., J. Toyras, M. Hakulinen, A. S. Aula, I. Tamminen, P. Julkunen, H. Kroger, and J. S. Jurvelin (2011). Structural parameters of normal and osteoporotic human trabecular bone are affected differently by microCT image resolution. *Osteoporos. Int.* 22(1): 167-177.
- Jafari, S. M., C. Coyle, S. M. Mortazavi, P. F. Sharkey, and J. Parvizi (2010). Revision hip arthroplasty: infection is the most common cause of failure. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468(8): 2046-2051.
- Jiang, X., B. Lv, Y. Wang, Q. Shen, and X. Wang (2017). Bactericidal mechanisms and effector targets of TiO₂ and Ag-TiO₂ against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 66(4): 440-446.
- Jiang, Y., J. J. Zhao, B. H. Mitlak, O. Wang, H. K. Genant, and E. F. Eriksen (2003). Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J. Bone Miner. Res.* 18(11): 1932-1941.
- Jilka, R. L., R. S. Weinstein, T. Bellido, A. M. Parfitt, and S. C. Manolagas (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines. *J. Bone Miner. Res.* 13(5): 793-802.
- Juan, L., Z. Zhimin, M. Anchun, L. Lei, and Z. Jingchao (2010). Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine* 5: 261-267.
- Jung, S. K., J. H. Kim, H. J. Kim, Y. H. Ji, J. H. Kim, and S. W. Son (2014). Silver nanoparticle-induced hMSC proliferation is associated with HIF-1 α -mediated upregulation of IL-8 expression. *J. Invest. Dermatol.* 134(12): 3003-3007.

Kakar, S. and P. Tornetta, 3rd (2007). Open fractures of the tibia treated by immediate intramedullary tibial nail insertion without reaming: a prospective study. *J. Orthop. Trauma* 21(3): 153-157.

Kalishwaralal, K., S. BarathManiKanth, S. R. Pandian, V. Deepak, and S. Gurunathan (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79(2): 340-344.

Kang, S. J., D. H. Kim, T. Mishig-Ochir, and B. J. Lee (2012). Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch. Pharm. Res.* 35(3): 409-413.

Keating, J. F., P. J. O'Brien, P. A. Blachut, R. N. Meek, and H. M. Broekhuysen (1997). Locking intramedullary nailing with and without reaming for open fractures of the tibial shaft. A prospective, randomized study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 79(3): 334-341.

Kellesarian, S. V., V. R. Malignaggi, T. V. Kellesarian, H. Bashir Ahmed, and F. Javed (2018). Does incorporating collagen and chondroitin sulfate matrix in implant surfaces enhance osseointegration? A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 47(2): 241-251.

Kendoff, D. O., T. Gehrke, P. Stangenberg, L. Frommelt, and H. Bosebeck (2016). Bioavailability of gentamicin and vancomycin released from an antibiotic containing bone cement in patients undergoing a septic one-stage total hip arthroplasty (THA) revision: a monocentric open clinical trial. *Hip Int.* 26(1): 90-96.

Khosla, S., M. J. Oursler, and D. G. Monroe (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrin Met* 23(11): 576-581.

Khurana, C., A. K. Vala, N. Andhariya, O. P. Pandey, and B. Chudasama (2014). Antibacterial activity of silver: the role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *J Biomed Mater Res A* 102(10): 3361-3368.

Kim, J. S., E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong, and M. H. Cho (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3(1): 95-101.

Kim, S. W., P. D. Pajevic, M. Selig, K. J. Barry, J. Y. Yang, C. S. Shin, W. Y. Baek, J. E. Kim, and H. M. Kronenberg (2012a). Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 27(10): 2075-2084.

Kim, T. H., M. Kim, H. S. Park, U. S. Shin, M. S. Gong, and H. W. Kim (2012b). Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 100(4): 1033-1043.

Kimmel, D. B. and T. J. Wronski (1990). Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 46(2): 101-110.

Knetsch, M. L. W. and L. H. Koole (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers* 3(1): 340-366.

Kochi, G., S. Sato, H. Ebihara, J. Hirano, Y. Arai, and K. Ito (2010). A comparative study of microfocus CT and histomorphometry in the evaluation of bone augmentation in rat calvarium. *J. Oral Sci.* 52(2): 203-211.

Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, Y. H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, and T. Kishimoto (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5): 755-764.

Konig, C., S. Schwank, and J. Blaser (2001). Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(1): 20-26.

Kornak, U., D. Kasper, M. R. Bosl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, and T. J. Jentsch (2001). Loss of the *ClC-7* chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104(2): 205-215.

Kose, N., A. Otuzbir, C. Peksen, A. Kiremitci, and A. Dogan (2013). A silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 471(8): 2532-2539.

Kuhn, K. D. and D. Hontzsch (2015a). Augmentation with PMMA cement. *Unfallchirurg* 118(9): 737-748.

Kuhn, S., J. Greenfield, C. Arand, A. Jarmolaew, P. Appelmann, D. Mehler, and P. M. Rommens (2015b). Treatment of distal intraarticular tibial fractures: A biomechanical evaluation of intramedullary nailing vs. angle-stable plate osteosynthesis. *Injury* 46 Suppl 4: S99-S103.

Kuhn, S., M. Hansen, and P. M. Rommens (2007). Extending the indication of intramedullary nailing of tibial fractures. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* 33(2): 159-169.

Kuhn, S., M. Hansen, and P. M. Rommens (2008). Extending the indications of intramedullary nailing with the Expert Tibial Nail. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* 75(2): 77-87.

Kurek, A., A. M. Grudniak, A. Krackiewicz-Dowjat, and K. I. Wolska (2011). New antibacterial therapeutics and strategies. *Pol. J. Microbiol.* 60(1): 3-12.

Lara, H. H., N. V. Ayala-Nunez, L. Ixtapan-Turrent, and C. Rodriguez-Padilla (2010a). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology* 8: 1.

Lara, H. H., N. V. Ayala-Nunez, L. D. I. Turrent, and C. R. Padilla (2010b). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microb Biot* 26(4): 615-621.

Lentino, J. R. (2003). Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin. Infect. Dis.* 36(9): 1157-1161.

Lentino, J. R. (2004). Infections associated with prosthetic knee and prosthetic hip. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6(5): 388-392.

Leunig, M. and R. Hertel (1996). Thermal necrosis after tibial reaming for intramedullary nail fixation. A report of three cases. *J. Bone Joint Surg. Br.* 78(4): 584-587.

- Li, S., T. Zhu, J. Huang, Q. Guo, G. Chen, and Y. Lai (2017). Durable antibacterial and UV-protective Ag/TiO₂@ fabrics for sustainable biomedical application. *Int J Nanomedicine* 12: 2593-2606.
- Liao, J., M. Anchun, Z. Zhu, and Y. Quan (2010). Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. *Int J Nanomedicine* 5: 337-342.
- Lips, P., P. Courpron, and P. J. Meunier (1978). Mean wall thickness of trabecular bone packets in human iliac crest - changes with age. *Calcif. Tissue Res.* 26(1): 13-17.
- Liu, J., D. A. Sonshine, S. Shervani, and R. H. Hurt (2010). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* 4(11): 6903-6913.
- Ljusberg, J., Y. Wang, P. Lang, M. Norgard, R. Dodds, K. Hultenby, B. Ek-Rylander, and G. Andersson (2005). Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 280(31): 28370-28381.
- Longhini, R., P. A. de Oliveira, A. P. de Souza Faloni, E. Sasso-Cerri, and P. S. Cerri (2013). Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J. Anat.* 222(2): 239-247.
- Longhini, R., P. A. de Oliveira, E. Sasso-Cerri, and P. S. Cerri (2014). Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J. Periodontol.* 85(8): 1115-1125.
- Lu, L., R. W. Sun, R. Chen, C. K. Hui, C. M. Ho, J. M. Luk, G. K. Lau, and C. M. Che (2008). Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir. Ther.* 13(2): 253-262.
- Lucke, M., G. Schmidmaier, S. Sadoni, B. Wildemann, R. Schiller, A. Stemberger, N. P. Haas, and M. Raschke (2003). A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 67(1): 593-602.
- Mah, T. F. and G. A. O'Toole (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9(1): 34-39.

Malik, A., Z. Mohammad, and J. Ahmad (2013). The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes Metab. Syndr.* 7(2): 101-107.

Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21(2): 115-137.

Marks, S. C. and S. N. Popoff (1988). Bone cell biology - the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* 183(1): 1-44.

Martin, T. J. (2014). Bone biology and anabolic therapies for bone: current status and future prospects. *J Bone Metab* 21(1): 8-20.

Matar, W. Y., S. M. Jafari, C. Restrepo, M. Austin, J. J. Purtill, and J. Parvizi (2010). Preventing infection in total joint arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.* 92 Suppl 2: 36-46.

Matharu, G. S., A. Judge, D. W. Murray, and H. G. Pandit (2018). Trabecular metal acetabular components reduce the risk of revision following primary total hip arthroplasty: A propensity score matched study from the National Joint Registry for England and Wales. *J. Arthroplasty* 33(2): 447-452.

Matsumoto, M., M. Kogawa, S. Wada, H. Takayanagi, M. Tsujimoto, S. Katayama, K. Hisatake, and Y. Nogi (2004). Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J. Biol. Chem.* 279(44): 45969-45979.

Meena, R. C., U. K. Meena, G. L. Gupta, N. Gahlot, and S. Gaba (2015). Intramedullary nailing versus proximal plating in the management of closed extra-articular proximal tibial fracture: a randomized controlled trial. *J. Orthop. Traumatol.* 16(3): 203-208.

Meier-Ruge, W. A. and E. Bruder (2008). Current concepts of enzyme histochemistry in modern pathology. *Pathobiology* 75(4): 233-243.

Meyer, M. H. and R. A. Meyer, Jr. (2007). Genes with greater up-regulation in the fracture callus of older rats with delayed healing. *J. Orthop. Res.* 25(4): 488-494.

Meyers, N., M. Sukopp, R. Jager, M. Steiner, R. Matthys, B. Lapatki, A. Ignatius, and L. Claes (2017). Characterization of interfragmentary motion associated with common osteosynthesis devices for rat fracture healing studies. *PLoS One* 12(4): e0176735.

Miyamoto, T. (2006). The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity. *Mod. Rheumatol.* 16(6): 341-342.

Mohanty, S., S. Mishra, P. Jena, B. Jacob, B. Sarkar, and A. Sonawane (2012). An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine* 8(6): 916-924.

Montanaro, L., P. Speziale, D. Campoccia, S. Ravaoli, I. Cangini, G. Pietrocola, S. Giannini, and C. R. Arciola (2011). Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* 6(11): 1329-1349.

Monzon, M., F. Garcia-Alvarez, A. Lacleriga, E. Gracia, J. Leiva, C. Oteiza, and B. Amorena (2001). A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic Staphylococcus aureus osteomyelitis and study antibiotic treatment. *J. Orthop. Res.* 19(5): 820-826.

Moreira, D. M., J. Oei, H. R. Rawls, J. Wagner, L. Chu, Y. Li, W. Zhang, and K. Whang (2015). A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod.* 85(2): 175-183.

Morra, M., C. Cassinelli, G. Cascardo, L. Mazzucco, P. Borzini, M. Fini, G. Giavaresi, and R. Giardino (2006). Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants. *J Biomed Mater Res A* 78(3): 449-458.

Mulari, M., J. Vaaraniemi, and H. K. Vaananen (2003). Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.* 61(6): 496-503.

Mulcahy, L. R., V. M. Isabella, and K. Lewis (2014). Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68(1): 1-12.

Muller, R. (2003). Bone microarchitecture assessment: current and future trends. *Osteoporos. Int.* 14(5): 89-95.

Muller, R., H. Van Campenhout, B. Van Damme, G. Van Der Perre, J. Dequeker, T. Hildebrand, and P. Rueggsegger (1998). Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23(1): 59-66.

Naik, K. and M. Kowshik (2017). The silver lining: towards the responsible and limited usage of silver. *J. Appl. Microbiol.* 123(5): 1068-1087.

Nakamura, T., Y. Hara, M. Tagawa, M. Tamura, T. Yuge, H. Fukuda, and H. Nigi (1998). Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J. Bone Miner. Res.* 13(6): 942-949.

Nakashima, K., X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer, and B. de Crombrughe (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1): 17-29.

Necula, B. S., J. P. van Leeuwen, L. E. Fratila-Apachitei, S. A. Zaat, I. Apachitei, and J. Duszczuk (2012). In vitro cytotoxicity evaluation of porous TiO(2)-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts. *Acta Biomater* 8(11): 4191-4197.

Neoh, K. G. and E. T. Kang (2011). Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications. *ACS Appl Mater Interfaces* 3(8): 2808-2819.

Neut, D., J. R. van Horn, T. G. van Kooten, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher (2003). Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(413): 261-268.

Nickel, J. C., I. Ruseska, J. B. Wright, and J. W. Costerton (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27(4): 619-624.

- Noda, I., F. Miyaji, Y. Ando, H. Miyamoto, T. Shimazaki, Y. Yonekura, M. Miyazaki, M. Mawatari, and T. Hotokebuchi (2009). Development of novel thermal sprayed antibacterial coating and evaluation of release properties of silver ions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 89(2): 456-465.
- O'Loughlin, P. F., S. Morr, L. Bogunovic, A. D. Kim, B. Park, and J. M. Lane (2008). Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90 Suppl 1: 79-84.
- Oei, J. D., W. W. Zhao, L. Chu, M. N. DeSilva, A. Ghimire, H. R. Rawls, and K. Whang (2012). Antimicrobial acrylic materials with in situ generated silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100(2): 409-415.
- Olmos, D., G. M. Pontes-Quero, A. Corral, G. Gonzalez-Gaitano, and J. Gonzalez-Benito (2018). Preparation and characterization of antimicrobial films based on LDPE/Ag nanoparticles with potential uses in food and health industries. *Nanomaterials (Basel)* 8(2).
- Oryan, A., A. Moshiri, A. Parizi Meimandi, and I. A. Silver (2013). A long-term in vivo investigation on the effects of xenogenous based, electrospun, collagen implants on the healing of experimentally-induced large tendon defects. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 13(3): 353-367.
- Otto-Lambertz, C., A. Yagdiran, F. Wallscheid, P. Eysel, and N. Jung (2017). Periprosthetic infection in joint replacement. *Dtsch Arztebl Int* 114(20): 347-353.
- Parisien, M. V., D. McMahon, N. Pushparaj, and D. W. Dempster (1988). Trabecular architecture in iliac crest bone biopsies: infra-individual variability in structural parameters and changes with age. *Bone* 9(5): 289-295.
- Patlolla, A. K., D. Hackett, and P. B. Tchounwou (2015). Genotoxicity study of silver nanoparticles in bone marrow cells of Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 85: 52-60.
- Patti, J. M., B. L. Allen, M. J. McGavin, and M. Hook (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 585-617.

Pauksch, L., J. Franke, R. Schnettler, and K. S. Lips (2014a). Synergistic toxicity of gentamicin- and nanosilver-doped polymethylmethacrylate bone cement on primary human osteoclasts. *Cells Tissues Organs* 199(5-6): 384-392.

Pauksch, L., S. Hartmann, M. Rohnke, G. Szalay, V. Alt, R. Schnettler, and K. S. Lips (2014b). Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater* 10(1): 439-449.

Pauksch, L., S. Hartmann, G. Szalay, V. Alt, and K. S. Lips (2014c). In vitro assessment of nanosilver-functionalized PMMA bone cement on primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *PLoS One* 9(12): e114740.

Peeters, O., T. Ferry, F. Ader, A. Boibieux, E. Braun, A. Bouaziz, J. Karsenty, E. Forestier, F. Laurent, S. Lustig, C. Chidiac, F. Valour, and B. J. I. s. g. Lyon (2016). Teicoplanin-based antimicrobial therapy in *Staphylococcus aureus* bone and joint infection: tolerance, efficacy and experience with subcutaneous administration. *BMC Infect. Dis.* 16(1): 622.

Penalba Arias, P., U. Furustrand Tabin, B. Betrisey, S. Vogt, A. Trampuz, and O. Borens (2015). Activity of bone cement loaded with daptomycin alone or in combination with gentamicin or PEG600 against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Injury* 46(2): 249-253.

Phan, T. C. A., J. Xu, and M. H. Zheng (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol. Histopathol.* 19(4): 1325-1344.

Pieper, J. S., A. Oosterhof, P. J. Dijkstra, J. H. Veerkamp, and T. H. van Kuppevelt (1999). Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20(9): 847-858.

Powers, C. M., A. R. Badireddy, I. T. Ryde, F. J. Seidler, and T. A. Slotkin (2011a). Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ. Health* 119(1): 37-44.

Powers, C. M., E. D. Levin, F. J. Seidler, and T. A. Slotkin (2011b). Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. *Neurotoxicol. Teratol.* 33(2): 329-332.

- Powers, C. M., T. A. Slotkin, F. J. Seidler, A. R. Badireddy, and S. Padilla (2011c). Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: distinct roles for particle size, coating and composition. *Neurotoxicol. Teratol.* 33(6): 708-714.
- Prosser, B. L., D. Taylor, B. A. Dix, and R. Cleeland (1987). Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(10): 1502-1506.
- Rammelt, S., E. Schulze, R. Bernhardt, U. Hanisch, D. Scharnweber, H. Worch, H. Zwipp, and A. Biewener (2004). Coating of titanium implants with type-I collagen. *J. Orthop. Res.* 22(5): 1025-1034.
- Recker, R., P. Masarachia, A. Santora, T. Howard, P. Chavassieux, M. Arlot, G. Rodan, L. Wehren, and D. Kimmel (2005). Trabecular bone microarchitecture after alendronate treatment of osteoporotic women. *Curr. Med. Res. Opin.* 21(2): 185-194.
- Renaud, A., M. Lavigne, and P. A. Vendittoli (2012). Periprosthetic joint infections at a teaching hospital in 1990-2007. *Can. J. Surg.* 55(6): 394-400.
- Ridenhour, B. J., G. A. Metzger, M. France, K. Gliniewicz, J. Millstein, L. J. Forney, and E. M. Top (2017). Persistence of antibiotic resistance plasmids in bacterial biofilms. *Evol Appl* 10(6): 640-647.
- Roux, S., F. Valour, J. Karsenty, M. C. Gagnieu, T. Perpoint, S. Lustig, F. Ader, B. Martha, F. Laurent, C. Chidiac, T. Ferry, and B. J. I. S. g. Lyon (2016). Daptomycin > 6 mg/kg/day as salvage therapy in patients with complex bone and joint infection: cohort study in a regional reference center. *BMC Infect. Dis.* 16: 83.
- Saeidi, N., X. Guo, A. E. Hutcheon, E. A. Sander, S. S. Bale, S. A. Melotti, J. D. Zieske, V. Trinkaus-Randall, and J. W. Ruberti (2012). Disorganized collagen scaffold interferes with fibroblast mediated deposition of organized extracellular matrix in vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 109(10): 2683-2698.
- Sanders, R., I. Jersinovich, J. Anglen, T. DiPasquale, and D. Herscovici, Jr. (1994). The treatment of open tibial shaft fractures using an interlocked intramedullary nail without reaming. *J. Orthop. Trauma* 8(6): 504-510.

- Santos, J. L., D. Pandita, J. Rodrigues, A. P. Pego, P. L. Granja, and H. Tomas (2011). Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr. Gene Ther.* 11(1): 46-57.
- Schaer, T. P., S. Stewart, B. B. Hsu, and A. M. Klibanov (2012). Hydrophobic polycationic coatings that inhibit biofilms and support bone healing during infection. *Biomaterials* 33(5): 1245-1254.
- Schemitsch, E. H., M. J. Kowalski, M. F. Swiontkowski, and R. M. Harrington (1995). Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J. Orthop. Res.* 13(3): 382-389.
- Schemitsch, E. H., M. J. Kowalski, M. F. Swiontkowski, and D. Senft (1994). Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J. Orthop. Trauma* 8(5): 373-382.
- Schierholz, J. M. and J. Beuth (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J. Hosp. Infect.* 49(2): 87-93.
- Schluesener, J. K. and H. J. Schluesener (2013). Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. *Arch. Toxicol.* 87(4): 569-576.
- Schmidmaier, G., M. Kerstan, P. Schwabe, N. Sudkamp, and M. Raschke (2017). Clinical experiences in the use of a gentamicin-coated titanium nail in tibia fractures. *Injury* 48(10): 2235-2241.
- Schwank, S., Z. Rajacic, W. Zimmerli, and J. Blaser (1998). Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(4): 895-898.
- Sharma, R., G. Kapusetti, S. Y. Bhong, P. Roy, S. K. Singh, S. Singh, C. K. Balavigneswaran, K. K. Mahato, B. Ray, P. Maiti, and N. Misra (2017). Osteoconductive amine-functionalized graphene-poly(methyl methacrylate) bone cement composite with controlled exothermic polymerization. *Bioconjug. Chem.* 28(9): 2254-2265.

Sheehan, E., J. McKenna, K. J. Mulhall, P. Marks, and D. McCormack (2004). Adhesion of Staphylococcus to orthopaedic metals, an in vivo study. *J. Orthop. Res.* 22(1): 39-43.

Shirley, D., D. Marsh, G. Jordan, S. McQuaid, and G. Li (2005). Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J. Orthop. Res.* 23(5): 1013-1021.

Sims, N. A. and J. H. Gooi (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19(5): 444-451.

Sodek, J. and M. D. McKee (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol.* 2000 24: 99-126.

Song, M. F., Y. S. Li, H. Kasai, and K. Kawai (2012). Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50(3): 211-216.

Southwood, R. T., J. L. Rice, P. J. McDonald, P. H. Hakendorf, and M. A. Rozenbils (1985). Infection in experimental hip arthroplasties. *J. Bone Joint Surg. Br.* 67(2): 229-231.

Spiegl, U., J. S. Jarvers, C. E. Heyde, and C. Josten (2017). Osteoporotic vertebral body fractures of the thoracolumbar spine: indications and techniques of a 360 degrees - stabilization. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* 43(1): 27-33.

Stein, G. S. and J. B. Lian (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.* 14(4): 424-442.

Sun, C. Y., Y. J. Che, and S. J. Lu (2015). Preparation and application of collagen scaffold-encapsulated silver nanoparticles and bone morphogenetic protein 2 for enhancing the repair of infected bone. *Biotechnol. Lett.* 37(2): 467-473.

Sun, P., J. Wang, Y. Zheng, Y. Fan, and Z. Gu (2012). BMP2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration in peri-implant bone defects model than BMP2 or BMP7 homodimer. *Dent. Mater. J.* 31(2): 239-248.

- Sun, Y., L. Wang, L. Sun, C. Guo, T. Yang, Z. Liu, F. Xu, and Z. Li (2008). Fabrication, characterization, and application in surface-enhanced Raman spectrum of assembled type-I collagen-silver nanoparticle multilayered films. *J. Chem. Phys.* 128(7): 074704.
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7(4): 292-304.
- Tamminen, I. S., H. Isaksson, A. S. Aula, E. Honkanen, J. S. Jurvelin, and H. Kroger (2011). Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *J. Bone Miner. Metab.* 29(4): 442-448.
- Tan, H., Z. Peng, Q. Li, X. Xu, S. Guo, and T. Tang (2012). The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials* 33(2): 365-377.
- Teitelbaum, S. L. (2007). Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am. J. Pathol.* 170(2): 427-435.
- Theuretzbacher, U. (2011). Resistance drives antibacterial drug development. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11(5): 433-438.
- Theuretzbacher, U. (2012). Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39(4): 295-299.
- Thomes, B., P. Murray, and D. Bouchier-Hayes (2002). Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *J. Bone Joint Surg. Br.* 84(5): 758-760.
- Trabulsy, P. P., S. M. Kerley, and W. Y. Hoffman (1994). A prospective study of early soft tissue coverage of grade IIIB tibial fractures. *J. Trauma* 36(5): 661-668.
- Trampuz, A., D. R. Osmon, A. D. Hanssen, J. M. Steckelberg, and R. Patel (2003). Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(414): 69-88.

Uchiyama, T., T. Tanizawa, H. Muramatsu, N. Endo, H. E. Takahashi, and T. Hara (1997). A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif. Tissue Int.* 61(6): 493-498.

Unosson, E., M. Morgenstern, H. Engqvist, and K. Welch (2016). In vitro antibacterial properties and UV induced response from *Staphylococcus epidermidis* on Ag/Ti oxide thin films. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27(3): 49.

Valour, F., J. P. Rasigade, S. Trouillet-Assant, J. Gagnaire, A. Bouaziz, J. Karsenty, C. Lacour, M. Bes, S. Lustig, T. Benet, C. Chidiac, J. Etienne, F. Vandenesch, T. Ferry, F. Laurent, and B. J. I. S. G. Lyon (2015). Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin. Microbiol. Infect.* 21(6): 568 e561-511.

van de Belt, H., D. Neut, W. Schenk, J. R. van Horn, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher (2001). Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop. Scand.* 72(6): 557-571.

Van Dijck, I., W. Budts, B. Cools, B. Eyskens, D. E. Boshoff, R. Heying, S. Frerich, W. Y. Vanagt, E. Troost, and M. Gewillig (2015). Infective endocarditis of a transcatheter pulmonary valve in comparison with surgical implants. *Heart* 101(10): 788-793.

Varisco, M., N. Khanna, P. S. Brunetto, and K. M. Fromm (2014). New antimicrobial and biocompatible implant coating with synergic silver-vancomycin conjugate action. *ChemMedChem* 9(6): 1221-1230.

Wang, Z., Y. Sun, D. Wang, H. Liu, and R. I. Boughton (2013). In situ fabrication of silver nanoparticle-filled hydrogen titanate nanotube layer on metallic titanium surface for bacteriostatic and biocompatible implantation. *Int J Nanomedicine* 8: 2903-2916.

Wei, Q. and L. Z. Ma (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14(10): 20983-21005.

Wilding, C. P., G. A. Cooper, A. K. Freeman, M. C. Parry, and L. Jeys (2016). Can a silver-coated arthrodesis implant provide a viable alternative to above knee amputation

in the unsalvageable, infected total knee arthroplasty? *J. Arthroplasty* 31(11): 2542-2547.

Wiss, D. A. and W. B. Stetson (1995). Unstable fractures of the tibia treated with a reamed intramedullary interlocking nail. *Clin. Orthop. Relat. Res.*(315): 56-63.

Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick, and E. A. Wang (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885): 1528-1534.

Wray, J. B. and C. J. Lynch (1959). The vascular response to fracture of the tibia in the rat. *J. Bone Joint Surg. Am.* 41-A: 1143-1148.

Wu, P., R. Xie, K. Imlay, and J. K. Shang (2010). Visible-light-induced bactericidal activity of titanium dioxide codoped with nitrogen and silver. *Environ. Sci. Technol.* 44(18): 6992-6997.

Xu, Y., H. Meng, H. Yin, Z. Sun, J. Peng, X. Xu, Q. Guo, W. Xu, X. Yu, Z. Yuan, B. Xiao, C. Wang, Y. Wang, S. Liu, S. Lu, Z. Wang, and A. Wang (2018). Quantifying the degradation of degradable implants and bone formation in the femoral condyle using micro-CT 3D reconstruction. *Exp. Ther. Med.* 15(1): 93-102.

Xue, Y., S. Zhang, Y. Huang, T. Zhang, X. Liu, Y. Hu, Z. Zhang, and M. Tang (2012). Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.* 32(11): 890-899.

Yamaza, T., T. Goto, T. Kamiya, Y. Kobayashi, H. Sakai, and T. Tanaka (1998). Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone* 23(6): 499-509.

Yang, S. H., A. M. Tsatsakis, G. Tzanakakis, H. S. Kim, B. Le, M. Sifaki, D. A. Spandidos, C. Tsukamoto, K. S. Golokhvast, B. N. Izotov, and G. Chung (2017). Soyasaponin Ag inhibits alphaMSH-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells via the downregulation of TRP2. *Int. J. Mol. Med.* 40(3): 631-636.

Yavropoulou, M. P. and J. G. Yovos (2008). Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 8(3): 204-216.

Yonekura, Y., H. Miyamoto, T. Shimazaki, Y. Ando, I. Noda, M. Mawatari, and T. Hotokebuchi (2011). Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia. *J. Bone Joint Surg. Br.* 93(5): 644-649.

Yoshida, H., S. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L. D. Shultz, and S. Nishikawa (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345(6274): 442-444.

Zhang, B. G., D. E. Myers, G. G. Wallace, M. Brandt, and P. F. Choong (2014). Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int. J. Mol. Sci.* 15(7): 11878-11921.

Zhang, R., P. Lee, V. C. Lui, Y. Chen, X. Liu, C. N. Lok, M. To, K. W. Yeung, and K. K. Wong (2015). Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model. *Nanomedicine* 11(8): 1949-1959.

Zhao, Y., Y. Sun, C. Tian, B. Gao, Y. Wang, H. Shon, and Y. Yang (2017). Titanium tetrachloride for silver nanoparticle-humic acid composite contaminant removal in coagulation-ultrafiltration hybrid process: floc property and membrane fouling. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24(2): 1757-1768.

Zhou, Y., R. Chen, T. He, K. Xu, D. Du, N. Zhao, X. Cheng, J. Yang, H. Shi, and Y. Lin (2016). Biomedical potential of ultrafine Ag/AgCl nanoparticles coated on graphene with special reference to antimicrobial performances and burn wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 8(24): 15067-15075.

Zimmerli, W. and P. E. Ochsner (2003). Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 31(2): 99-108.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Zuerst bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips, Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen, die mir das interessante Thema überlassen und mich stets außerordentlich kompetent betreut hat. Als Doktormutter stand sie mir bei allen Fragen zur Verfügung und hat durch konstruktive Kritiken an der erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit beigetragen. Für ihre freundliche und kollegiale Kooperation bin ich äußerst dankbar.

Dem ehemaligen Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikum Gießen, Herrn Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler und dem jetzigen Direktor Herrn Prof. Dr. Christian Heiß möchte ich für ihre Unterstützung dieses Projekts und für die Bereitstellung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen danken.

Großer Dank geht auch an Frau Dr. Ursula Sommer aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen, die mich mit viel Geduld in histomorphometrische Methoden eingewiesen und mir diesbezüglich hilfreiche Ratschläge gegeben hat.

Den beiden ehemaligen Kolleginnen, Dipl. Biol. Sonja Hartmann und Dr. rer. nat. Linda Pauksch, danke ich für die Durchführung der experimentellen Tierversuche. Bei Olga Dakischew bedanke ich mich für die engagierte Unterstützung bei der statistischen Ausarbeitung der Ergebnisse. Allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen danke ich für ihre vielfältigen Beiträge bei der Gewinnung und Aufarbeitung der Proben. Dank gebührt der Labormitarbeiterin Ida Oberst, die mich in diverse Laborarbeiten eingewiesen und bei der Probenaufbereitung tatkräftig unterstützt hat. Vielen Dank auch an meine Mitdoktoranden Andre Worm und Alexander Lampe für die gute und kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Förderung des BioNanoCare-Projekts sowie aap Biomaterials GmbH für die Osteosynthesematerialien.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und insbesondere bei meinen lieben Eltern für ihre unendliche Unterstützung, die wesentlich zum erfolgreichen Abschluss des Studiums und der Promotion beigetragen hat.